



Caractérisation d'anomalies cytogénétiques et moléculaires dans la leucémie lymphoïde chronique

Adrien Cosson

► To cite this version:

Adrien Cosson. Caractérisation d'anomalies cytogénétiques et moléculaires dans la leucémie lymphoïde chronique. Cancer. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066246 . tel-01236000

HAL Id: tel-01236000

<https://theses.hal.science/tel-01236000>

Submitted on 1 Dec 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Physiologie et Physiopathologie

Présentée et soutenue par

Adrien COSSON

Le Mardi 15 Septembre 2015

**CARACTÉRISATION D'ANOMALIES CYTOGÉNÉTIQUES ET
MOLÉCULAIRES DANS LA LEUCÉMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE**

Thèse dirigée par le Pr. Florence NGUYEN-KHAC

JURY

Pr. Véronique LEBLOND

Dr. Olivier BERNARD

Dr. Nadine VARIN-BLANK

Dr. Jozo DELIC

Dr. Loïc YSEBAERT

Pr. Florence NGUYEN-KHAC

Président du Jury

Examinateur

Examinateur

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse



THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Physiologie et Physiopathologie

Présentée et soutenue par

Adrien COSSON

Le Mardi 15 Septembre 2015

**CARACTÉRISATION D'ANOMALIES CYTOGÉNÉTIQUES ET
MOLÉCULAIRES DANS LA LEUCÉMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE**

Thèse dirigée par le Pr. Florence NGUYEN-KHAC

JURY

Pr. Véronique LEBLOND

Dr. Olivier BERNARD

Dr. Nadine VARIN-BLANK

Dr. Jozo DELIC

Dr. Loïc YSEBAERT

Pr. Florence NGUYEN-KHAC

Président du Jury

Examinateur

Examinateur

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à ma directrice de thèse Florence Nguyen-Khac. Il y a quatre ans, tu as cru en moi, tu m'as fait confiance. Je te remercie de m'avoir guidé tout au long de ces années, d'avoir été à mon écoute. J'ai appris tant de choses que je ne peux les lister. Merci pour les projets auxquels tu m'as permis de participer, et les gens que tu m'as fait rencontrer. Cela a été un réel plaisir d'avoir été l'étudiant d'une personne passionnée par son métier, par la recherche et la transmission de ses connaissances. Un grand merci pour tout !!!

Je remercie également Santos Susin. Merci pour tes conseils scientifiques et humains. Merci pour toutes les connaissances que tu m'as transmises, et de m'avoir accordé ta confiance. Cela a été un grand plaisir de travailler avec toi, au sein de ton laboratoire.

Je tiens également à remercier les rapporteurs et examinateurs de cette thèse, Dr Jozo Delic, Dr Loïc Ysebaert, Dr Nadine Varin-Blank et Dr Olivier Bernard. Merci au Pr Véronique Leblond d'avoir accepté de présider ce jury. Votre présence me permet d'atteindre l'étape ultime de cette magnifique aventure qu'est la thèse. Votre avis et votre jugement comptent beaucoup pour moi, et je suis honoré que vous ayez accepté d'évaluer mon travail de doctorat.

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé dans un laboratoire constitué très majoritairement de filles, et comme on dit « oh les filles oh les filles, elles me rendent marteau ». Mais j'ai travaillé dans un environnement rempli de joie et de bonne humeur. Ceci a été rendu possible grâce aux différents membres de mon équipe. Avant de les remercier, je voudrais présenter mes excuses à tous mes collègues de laboratoire, qui ont du subir la musique de Chante France à chaque fois qu'ils travaillaient en ma présence. J'espère ne pas vous avoir rendu sourd à la chanson française (je pense notamment à Claude François, Daniel Balavoine, France Gall, j'en passe, et des meilleurs). Merci à toute l'équipe 19 des Cordeliers, les membres actuels et passés. Merci Marie-Noëlle pour nos discussions, pour l'aide que tu m'as apportée. Merci Linda et Laura, mais aussi Gabriella pour tous ces moments dans le bureau qui m'ont permis de souffler. Audrey, alias « la petite », tu m'as beaucoup fait rire (je me souviendrai par exemple de ton problème de tampon de transfert), et je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite. Caroline, merci pour ton aide au cours de ce projet. Silvia, merci pour ta joie de vivre, ton rire, ça été un grand plaisir de travailler avec toi. Carolina, je me souviendrai toujours de nos soirées « entre thésard » au labo avec Mathieu, mais aussi ta chaleur humaine, ton humour. Mathieu, mon cher

Mathieu, l'autre homme du laboratoire (avec Santos), c'est un garçon pas comme les autres. Quand je suis arrivé, il m'a dit : « vient prendre un café », et on s'est raconté nos vies, on a rit, on a pleuré. Ça a été un grand plaisir d'être au laboratoire avec toi, on a beaucoup échangé, merci pour tout. Tu as rendu cette thèse encore plus agréable. Je tiens tout particulièrement à remercier Lauriane, j'ai beaucoup apprécié nos échanges scientifiques (et autres). Merci pour ton soutien. Merci aussi à Laure et Claire pour leurs conseils, leur joie de vivre et tous les bons moments partagés.

Merci aussi aux membres de l'équipe qui sont à la Pitié-Salpêtrière : Hélène (toujours amicale et chaleureuse, merci pour ton cours de français) et Frédéric, Myrto et Magali. Merci Clémentine pour toute ton aide. Merci énormément Elise, qui est un peu la grande sœur des projets 2p et del14q. Merci pour les pauses que nous avons partagées, tes conseils toujours avisés. Cela a aussi été un grand plaisir de travailler avec toi.

Je remercie aussi le personnel de la laverie et nos gestionnaires : Christine, Nathalie, Esther, Sladjana, Thomas, Véronique, Laurence (à la Pitié). Mon travail n'aurait pas été réalisable sans vous. Merci aussi aux plateformes techniques, celle du CICC aux Cordeliers avec Estelle et Hélène, la plateforme de cytométrie de l'Institut Gustave Roussy avec Philippe. Merci à vous pour tous les tris que vous avez fait pour moi.

Merci aussi à tous les autres membres du Centre de Recherche des Cordeliers. Je pense à Dorine, Gwennan, Basile et Antoine, ainsi que Mathieu (chez les rigolos du 1^{er}). Mais aussi à Katia et Thomas. Merci aussi à Isabelle, « ma binôme » du weekend, nos petites pauses café du samedi/dimanche me manqueront.

J'aimerais également remercier les organismes qui m'ont apporté leur soutien financier pendant la thèse, la Société Française d'Hématologie et la Fondation pour la Recherche Médicale.

Je souhaite aussi remercier tous les cliniciens qui m'ont permis d'obtenir des échantillons de patients. Merci aussi aux patients, pour leur aide, sans quoi ces études n'auraient pas pu être réalisées.

Merci aussi à mes anciennes équipes, celles de Sanofi et du Collège de France. J'ai tant appris avec vous. Je pense notamment à Sandra V., mon binôme à Sanofi, mais aussi Dorine C. et Cécile O. Merci Cécile pour les conseils que tu continues à me prodiguer encore maintenant. Merci à Michel V., le Roi du clonage, Sophie V., Christine R., Carole G. Merci à vous.

Merci aussi à tous les membres de l'unité 1170 de l'IGR chez qui j'ai passé une grande partie de ma première année de thèse. Merci pour votre accueil et votre chaleur humaine. Merci à Cécile pour son rire, qui même dans les pires moments peut réussir à te décontracter. Merci à Véronique pour son aide technique, mais aussi pour ses conseils (merci aussi pour les liposomes). Merci « au grand Damien », toujours là pour rendre service. Laurianne, « copain de galère », tu soutiens juste après moi, courage. Je ne peux oublier Frédérik, avec qui j'ai passé des heures à trier des cellules, à faire des plaques de PCR, et à analyser des séquences. Merci pour tes conseils, nos discussions, ta joie de vivre. Te voilà reparti à Berlin, mais j'espère te revoir bientôt.

Je remercie aussi Laura et Jack, ainsi que leur deux magnifiques filles. Que le temps a passé depuis les bancs du lycée Laura. Je suis heureux que nous ayons gardé contact, et du chemin que nous avons tout les deux parcourus respectivement. Merci pour ton écoute et toutes les soirées passées ensemble. Nos rigolades et le reste.

Je remercie aussi toute ma famille pour leur soutien et leur écoute. En particulier Lawrence, Corinne et Bernard, Monique et Thierry, Vanessa et Pascal, Marc et Meira, (ma belle-famille aussi, Evelyne, Philippe et Wickie). Toi aussi Jean-Marc, qui pendant tes consultations pour mes petits bobos me demandait toujours où j'en étais. Merci pour les moments de distraction qui m'ont parfois fait (un peu) oublier la thèse. Une grosse pensée pour mon grand père Sam, le centenaire de la famille. Mes chers parents merci, pour vos conseils. Vous m'avez toujours poussés à aller plus loin, à continuer. C'est en grande partie grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui.

Enfin, je dis un grand merci à Marie. Merci pour ton soutien tout au long de ces années. Merci de m'avoir encouragé à continuer, d'avoir été patiente avec moi. Merci pour avoir toujours été là.

Table des matières

<i>Abréviations</i>	1
<i>Liste des tableaux</i>	4
<i>Liste des figures</i>	5
 I. Introduction	6
<i>Chapitre I : La Leucémie lymphoïde chronique</i>	<i>7</i>
I. Généralités	7
II. Epidémiologie et diagnostic	7
III. Classifications	9
IV. Quelques facteurs pronostiques biologiques	11
1. Le statut mutationnel <i>IGHV</i>	11
2. <i>ZAP70</i>	11
3. <i>CD38</i>	12
4. Valeurs pronostiques des principaux facteurs, résumé.....	12
V. Les anomalies cytogénétiques	14
1. La délétion 13q	15
2. La délétion 11q	16
3. La trisomie 12	16
4. La délétion 17p	17
5. Le gain 2p.....	17
6. La délétion 14q	19
VI. Les anomalies génétiques	20
1. <i>SF3B1</i>	22
2. <i>NOTCH1</i>	22
3. <i>MYD88</i>	23
4. <i>CRM1</i> ("Chromosomal Region Maintenance 1")/ <i>XPO1</i> ("exportine 1").....	24
VII. La notion de clonalité	24
VIII. L'origine de la LLC	25
IX. Le traitement des LLC	26

Chapitre II : La mort cellulaire programmée	31
I. Généralités.....	31
II. Définition	32
III. Classification.....	32
IV. Les acteurs majeurs de l'apoptose.....	37
V. Implications physiopathologiques de l'apoptose dans la LLC	41
VI. Induction de la mort cellulaire par le traitement de la LLC	42
Chapitre III : L'export nucléocytoplasmique	44
I. Généralités.....	44
II. La superfamille des Karyophérines	45
1. Les importines, les exportines, les transportines	45
2. Mécanisme d'export nucléaire : exemple de XPO1	46
III. XPO1, rôle et cible thérapeutique dans les cancers	47
1. XPO1 et Cancer	47
2. XPO1, une cible thérapeutique.....	49
II. Objectifs de thèse	53
III. Résultats et Discussion	55
I. Article 1 – Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients	56
II. Article 2 – 14q deletions are associated with trisomy 12, <i>NOTCH1</i> mutations and unmutated <i>IGHV</i> genes in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma.....	97
III. Article 3 – The gain of the short arm of chromosome 2 (2p+) induces <i>XPO1</i> overexpression and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia	121
IV. Conclusion	150
V. Références Bibliographiques	153

Abréviations

A

ADCC : « Antibody-dependent cellular cytotoxicity »
ADN : Acide désoxyribonucléotide
AHS2 : « AHA1, activator of heat shock 90 kDa protein ATPase homolog 2 (yeast) »
AIF : « Apoptosis Inducing Factor »
ALL : « Acute Lymphoid Leukemia »
ATM : « Ataxia Telangiectasia Mutated »
ATP : Adénosine Triphosphate

B

β 2-M : « Beta2-Microglobulin »
Bad : « Bcl-2 Antagonist of cell death »
Bak : « Bcl-2 Homologous Antagonist/killer »
Bax : « Bcl-2 Associated X »
BCL11A : « B-cell lymphoma/leukemia 11A »
Bcl-2 : « B Cell Lymphoma »
BCR : « B Cell Receptor »
BH : « Bcl-2 Homology »
Bid : « BH3 Interacting Domain Death »
Bik : « Bcl-2 Interacting Killer »
Bim : « BH3 Interacting Mediator »
BIRC6 : « Baculovirus Internal Repeat Containing 6 »
BRD2 : « Bromodomain containing 2 »
Btk : « Bruton's Tyrosine Kinase »

C

CDC : « Complement dependent cytotoxicity »

CGH : « Comparative Genomic Hybridization »
CIRS : « Cumulative Illness Rating Scale »
CRM1 : « Chromosomal Region Maintenance 1 »

D

DDX3X : « DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 3, X-linked »
DIABLO : « Direct IAP Binding Protein »
DNA : « Deoxyribonucleic Acid »

E

EMSA : « Electrophoretic Mobility Shift Assay »
EndoG : Endonucléase G

F

FBXW7 : « F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase »
FCR : Fludarabine Cyclophosphamide
Rituximab
FISH : « Fluorescent *In Situ* Hybridization »

G

GATA2 : « GATA binding protein 2 »
GTP : Guanosine Triphosphate

H

HSC : « Hematopoietic Stem Cell »
HSCT : « Hematopoietic Stem Cell Transplantation »

I

IAP : « Inhibitor of Apoptosis Protein »
IGHV : « Immunoglobulin Heavy Chain Variable »
IKK β : « Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta »
I κ B : « Inhibitor of NF- κ B »
INM : « Inner Nuclear Membrane »

L

LAM : Leucémie Aigue Myéloïde
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
LMB : Leptomycine B (= Elactocin)
LR-NES : « Leucine Rich-Nuclear Export Signal »

M

MAPK : « Mitogen-Activated Protein Kinase »
MBL : « Monoclonal B Lymphocytosis »
Mcl-1 : « Myeloid Cell Leukemia-1 »
MCP : Mort Cellulaire Programmée
MDM2 : « Murine Double Minute 2 »
MDR : « Minimal Deleted Region »
MYD88 : « Myeloid Differentiation primary response 88 »

N

NCCD : « Nomenclature Committee on Cell Death »
NES : « Nuclear Export Signal »
NF- κ B : « Nuclear Factor - κ B »
NFAT : « Nuclear Factor Activated T-cell »
NGS : « Next Generation Sequencing »

NK : « Natural Killer cells »
NLS : « Nuclear Localization Signal »
NPC : « Nuclear Pore Complex »
NPM1 : « Nucleophosmin »
NUP : Nucléoporine

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ONM : « Outer Nuclear Membrane »
OS : « Overall Survival »

P

PAPOLG : Poly(A) Polymerase Gamma
PARP : Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PEX13 : « Peroxisomal biogenesis factor 13 »
PFS : « Progression Free Survival »
PI : « Propidium Iodide »
PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase
PL : Leucémie Prolymphocytaire
PUS10 : « Pseudouridylate synthase 10 »

R

RAD51B : « RAD51 paralog B »
Rb : Retinoblastome
RFC : Rituximab – Fludarabine – Cyclophosphamide
RIOK3 : RIO kinase 3
RNA : « Ribonucleic Acid »
ROS : « Reactive Oxygen Species »
RUNX1 : « runt-related transcription factor 1 »

S

SDS-PAGE : « Sodium-Dodecyl-Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis »

SEER : « Surveillance, Epidemiology, and End Results Program »

SF3B1 : « Splicing Factor 3b, subunit 1 »

SINE : « Specific Inhibitors of Nuclear Export »

siRNA : « small interfering RNA »

SLL : « Small Lymphocytic Lymphoma »

SNP : « Single Nucleotide Polymorphism »

T

TCR : « T Cell Receptor »

TLR : « Toll-Like Receptor »

TNF : « Tumor Necrosis Factor »

TSP : « Tumor Suppressor Proteins »

U

USP34 : « Ubiquitin Specific peptidase 34 »

W

WES : « Whole Exome Sequencing »

WGS : « Whole Genome Sequencing »

X

XIAP : « X-linked inhibitor of apoptosis »

XPO1 : Exportine 1

Z

ZAP70 : « Zeta-associated Protein of 70 kDa »

ZFP36L1 : « ZFP36 ring finger protein-like 1 »

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Calcul du score de Moreau/Matutes	9
Tableau 2 :	Classification de Rai	10
Tableau 3 :	Classification de Binet	10
Tableau 4 :	Principaux marqueurs pronostiques décrits dans la LLC	13
Tableau 5 :	Traitements des patients LLC	27
Tableau 6 :	Modalités des principaux types de Mort Cellulaire Programmée	34

Liste des figures

Figure 1 :	Analyse cytologique des cellules sanguines d'un patient atteint de LLC	8
Figure 2 :	Impact sur la survie globale de différentes anomalies cytogénétiques.....	14
Figure 3 :	Identification d'une région minimale de gain sur le 2p.....	19
Figure 4 :	Exemple d'impact sur la survie globale de différentes mutations génétiques dans la LLC20	
Figure 5 :	Principaux processus biologiques altérés par des mutations géniques	21
Figure 6 :	Mutations affectant le gène <i>SF3B1</i> dans la LLC	22
Figure 7 :	Identification de mutations précoces ou tardives dans la LLC.....	25
Figure 8 :	Voie de signalisation de l'apoptose	36
Figure 9 :	Les protéines de la famille Bcl-2	38
Figure 10 :	La mitochondrie, les caspases, la famille Bcl-2 et l'apoptose	40
Figure 11 :	La balance entre la vie et la mort d'une cellule cancéreuse en fonction des signaux quelle reçoit	42
Figure 12 :	Structure schématisé du NPC	45
Figure 13 :	Mécanisme d'export nucléocytoplasmique régulé par CRM1/XPO1	47
Figure 14 :	Essais cliniques avec Selinexor (KPT-330) dans les cancers.....	51

I. Introduction

Chapitre I. La Leucémie Lymphoïde Chronique

I. Généralités

Les hémopathies malignes sont divisées en deux catégories, les leucémies et les lymphomes. La leucémie se définit par la prolifération et l'accumulation dans le sang et la moelle osseuse de cellules tumorales soit d'origine myéloïde, soit d'origine lymphoïde. On parle alors de leucémie myéloïde ou lymphoïde, aiguë ou chronique selon qu'il s'agit de cellules immatures (blastiques) ou matures. Les lymphomes correspondent à une forme différente de cancers du sang, où l'on observe une prolifération et une accumulation de cellules tumorales dans les organes lymphoïdes secondaires.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé à la leucémie lymphoïde chronique (LLC) ainsi qu'au lymphome lymphocytaire (SLL, ou « Small Lymphocytic Lymphoma »), une catégorie de lymphome non-Hodgkinien de faible grade de malignité. Ces deux hémopathies sont caractérisées par la présence de lymphocytes B matures, exprimant à leurs surfaces les antigènes CD5 et CD23. On différencie la LLC du fait de la présence d'une phase leucémique circulante dans le sang pour la LLC avec la possibilité d'une infiltration dans les ganglions et la moelle, du SLL qui est caractérisé par la présence de cellules leucémiques uniquement dans les ganglions lymphatiques. Du fait de leurs similarités aux niveaux morphologique et immunophénotypique, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) considère que la LLC et le SLL sont des manifestations différentes d'une même pathologie, et les a donc classés dans la même catégorie (LLC/SLL)¹.

Avant les années 1990, la LLC était considérée comme une maladie relativement homogène du lymphocyte B mature, immunologiquement incompetent, ne pouvant se diviser et résistant à l'apoptose *in vivo*². Cependant, grâce aux avancées en cytométrie en flux, ainsi que l'établissement de nouvelles technologies comme les puces à ADN et le séquençage à haut-débit, ce dogme a été abandonné et de nouveaux concepts ont émergé, ce qui a permis d'améliorer la compréhension de la physiopathologie de la LLC.

II. Epidémiologie et diagnostic

La LLC est la leucémie la plus fréquemment observée dans les pays occidentaux, représentant 20 à 30% des cas parmi tous les patients atteints de leucémie, alors qu'en Asie la LLC ne représente que 5% des leucémies. Dans 90% des cas, le patient est âgé de plus de 50 ans, l'incidence

augmentant avec l'âge (avec une médiane au diagnostic de 72 ans), et 31% des patients sont âgés de moins de 64 ans au diagnostic d'après les chiffres du SEER (« Surveillance, Epidemiology, and End Results Program ») en 2013. Il n'est d'ailleurs pas exceptionnel de détecter cette maladie chez des sujets plus jeunes (30-39 ans). Les hommes sont plus touchés que les femmes, avec un *sex ratio* Homme / Femme de 1,7 / 1³. Dans les Pays Occidentaux, l'incidence de la LLC est de 5,8 et 3,0 pour 100 000 hommes et femmes respectivement. En France, les chiffres sont légèrement plus bas avec une incidence de 2,4 pour les hommes et 1,6 pour les femmes pour 100 000. Bien que cette pathologie soit considérée comme une maladie acquise, il existe des formes familiales de LLC, suggérant que la piste génétique n'est pas à écarter⁴. Une étude réalisée par une approche génomique (analyse des polymorphismes par SNP-array) avait d'ailleurs mis en évidence des locus prédisposant au développement de la LLC par l'étude de LLC familiales⁵.

De nos jours, la plupart des patients atteints de LLC sont diagnostiqués au cours d'un bilan sanguin de routine, où il est découvert une lymphocytose supérieure à 5 G/L. Des adénopathies et/ou une splénomégalie peuvent également être identifiées simplement à l'examen clinique. Les patients dits symptomatiques peuvent présenter une asthénie, un amaigrissement, ou parfois des infections à répétitions. Le diagnostic de la LLC est porté par l'immunophénotypage des lymphocytes provenant d'un prélèvement sanguin⁶. Il sera alors retrouvé l'expression d'un marqueur des lymphocytes T, le CD5, chez une population de lymphocytes B matures (CD19+, CD20+ et CD23+). Un examen cytologique doit également être réalisé, et sur le frottis on observe de petits lymphocytes présentant un cytoplasme très mince avec un noyau dense dans lequel le nucléole est difficilement identifiable (**cf figure 1**).

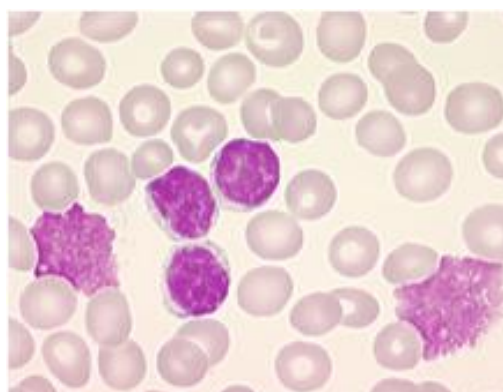


Figure 1 : Analyse cytologique des cellules sanguines d'un patient atteint de LLC. Les lymphocytes B de LLC sont identifiés par un marquage violet du noyau et la présence d'un cytoplasme très réduit. Souvent, on peut observer des cellules éclatées (dûes à l'étalement de l'échantillon lors de l'analyse sur lame) appelées ombres de Gümprich .

A noter que dans le cas où la population pathologique est inférieure à 5 G/L, le patient est défini comme présentant une lymphocytose B monoclonale (MBL, « Monoclonal B Lymphocytosis »). Une MBL est souvent considérée comme la phase pré-leucémique de la LLC, les patients étant alors suivis pour surveiller l'évolution de cette lymphocytose^{7,8}. Il est tout de fois important de préciser que seulement 1-2% des cas en moyenne des MBL vont développer une LLC par an⁹⁻¹¹.

Pour porter le diagnostic de LLC et la distinguer des autres hémopathies B lymphoprolifératives, on utilise en France le Score modifié de Matutes^{12,13}. Ce système est basé sur l'évaluation de 5 paramètres qui vont faire attribuer un point ou non (**cf tableau 1**). Dans le cas où le score est de 3, le patient est diagnostiqué comme atteint d'une LLC atypique, un score de 4-5 d'une LLC, et dans le cas où le score est inférieur à 3, le diagnostic de LLC est exclu.

Marqueur	+ 1 point	Pas de point
Expression des immunoglobulines de surface	Faible	Fort
CD5	Positif	Négatif
CD23	Positif	Négatif
FMC7	Négatif	Positif
CD22 ou CD79b	Faible	Fort

Tableau 1 : Calcul du score de Moreau/Matutes^{12,13}.

III. Classifications

Il existe à ce jour deux systèmes de classification des LLC, prenant en compte des facteurs cliniques et biologiques. Le premier, développé par Rai *et al.* en 1975¹⁴ est utilisé aux Etats-Unis et divise à l'origine les LLC en 5 catégories. Cette classification fut ensuite simplifiée à 3 groupes en 1987¹⁵ (risque faible, intermédiaire ou élevé)(**cf tableau 2**). Elle prend en compte la lymphocytose, les adénopathies, la splénomégalie, la présence d'anémie et de thrombocytopénie.

Stade Rai	Nouvelle classification	Définition	Médiane de survie
0	Risque faible	Lymphocytose	> 10 ans
I	Risque intermédiaire	Lymphocytose + Lymphadénopathie	7-9 ans
II	Risque intermédiaire	Lymphocytose + Splénomégalie ± Lymphadénopathie	
III	Risque élevé	Lymphocytose + Anémie ± Lymphadénopathie ou Splénomégalie	1,5-5 ans
IV	Risque élevé	Lymphocytose + Thrombocytopénie ± Anémie ± Splénomégalie ± Lymphadénopathie	

Tableau 2 : Classification de Rai^{14,15}. ^aLymphocytose > 5 G/L ; ^bAnémie, Hémoglobine < 11 g/dL ;
^cThrombocytopénie, plaquettes < 100.10⁹/L.

Le second, créé par Binet *et al.* en France en 1981¹⁶ est utilisé en Europe et classe les LLC en 3 catégories, selon le nombre d'aires ganglionnaires atteintes, et la présence d'une anémie ou d'une thrombopénie. Les principales aires ganglionnaires prises en compte dans cette classification sont : les régions cervicale axillaires, inguinales, la rate et le foie¹⁶. Il faut plus de trois aires ganglionnaires cliniquement envahies pour être classé en stade B. S'il existe une anémie et/ou une thrombopénie, le patient est classé en stade C (**cf tableau 3**).

Stade Binet	Numération sanguine	Aires envahies	Médiane de survie
A	Hémoglobine > 100 g/L Plaquettes > 100.10 ⁹ /L	< 3	> 10 ans
B	Hémoglobine > 100 g/L Plaquettes > 100.10 ⁹ /L	> 3	7 ans
C	Hémoglobine < 100 g/L Et/ou Plaquettes < 100.10 ⁹ /L	Quelque soit le nombre	5 ans

Tableau 3 : Classification de Binet¹⁶.

A côté de ces classifications, qui sont encore à l'heure actuelle utilisées pour la prise de décision thérapeutique, d'autres facteurs pronostiques sont décrits dans la LLC.

IV. Quelques facteurs pronostiques biologiques

En dehors des anomalies cytogénétiques et des nouvelles mutations géniques qui seront traitées à part, les facteurs pronostiques classiques décrits dans la LLC sont le temps de doublement de la lymphocytose, le statut mutationnel des gènes qui codent pour la partie variable des chaînes lourdes des immunoglobulines (*IGHV*), l'expression de ZAP70, et la positivité du CD38. D'autres paramètres sont moins utilisés en routine comme le dosage du CD23 soluble ou de la thymidine kinase.

1. Le statut mutationnel *IGHV*

Le statut mutationnel des gènes *IGHV* est un marqueur pronostique analysé dans tous les protocoles. Les gènes *IGHV* sont considérés mutés dans la LLC lorsque le pourcentage d'homologie de séquence avec les cellules germinales est < 98%.

Les LLC avec un statut muté pour les *IGHV* ont un bon pronostic, ce statut muté étant plus fréquent chez les LLC stade A, ou en présence de la délétion 13q isolée^{17,18}. Par ailleurs, la mutation du gène *MYD88*, également facteur de bon pronostic, est exclusivement retrouvée dans cette catégorie de LLC *IGHV* muté¹⁹. Les LLC avec un statut non-muté sont plus fréquentes dans les formes avancées de la maladie, stades Binet B/C.

A noter que le statut mutationnel des *IGHV* reste relativement constant au cours de la maladie²⁰. Mais il peut y avoir des sous-clones. Indépendamment du pourcentage de mutation des *IGHV* chez les patients, il a été observé des réarrangements identiques récurrents, les plus fréquents étant les réarrangements *IGHV1-69*, *IGHV3-21* ou encore *IGHV4-34*. La présence de BCR quasi-identique suggère qu'une sélection antigénique intervient au cours de la leucémogénèse de la LLC²¹.

2. ZAP70

La protéine « Zeta-associated protein of 70 kDa », plus communément appelée ZAP70 est une protéine kinase membre de la famille des tyrosines kinase Syk, jouant un rôle clé dans la transduction du signal par le récepteur des cellules T, le TCR, après stimulation antigénique. Chez un individu sain, ZAP70 est exprimée dans les cellules T, et absente dans les lymphocytes B. Cependant, on retrouve dans la LLC des patients exprimant de façon plus ou moins élevée cette protéine, son expression étant associée à un mauvais pronostic en terme de nécessité de traitement²². Plus récemment il a été décrit que l'expression de ZAP70 augmentait l'adhésion des cellules de LLC aux cellules stromales présentes

au niveau de la moelle osseuse²³. L'association entre l'expression de ZAP70 et un statut non muté des *IGHV* a également été décrite²⁴, bien que l'expression de ZAP70 soit plus corrélée à une nécessité de traitement que le statut mutationnel²².

Bien que la valeur pronostique de l'expression de ZAP70 soit acceptée par la communauté scientifique, une étude a mis en évidence que l'expression de ZAP70 variait au cours de la maladie²⁵. Utilisant différentes techniques de détection de ZAP70, cette étude montre que des patients LLC n'exprimant pas initialement ZAP70 sont devenu ZAP70 positif, et inversement. La valeur pronostique de cette anomalie reste donc valable mais soulève la question de la nécessité de renouveler sa détection au cours de l'évolution de la maladie.

3. CD38

La protéine CD38 est une glycoprotéine transmembranaire dont l'expression dans la LLC a été associée à un mauvais pronostic. Le seuil d'expression a pu être défini car il a été identifié une association entre le statut non-muté des *IGHV* des cellules de LLC avec une expression du CD38 > 30%. Inversement, les LLC avec un statut muté *IGHV* sont associées à une expression du CD38 < 30%²⁶. De plus, l'expression du CD38 a été associée à d'autres facteurs de mauvais pronostic comme la présence d'adénopathies, un taux élevé de β 2-microglobuline et de CD23 soluble, un temps de doublement de la lymphocytose plus court, ainsi qu'une survie plus courte²⁷. Cependant, et de façon similaire à l'expression de ZAP70 et de sa valeur pronostique, l'expression du CD38 chez les patients LLC semble varier au cours de la maladie²⁸. De façon plus problématique, le seuil de positivité varie également selon les études, on retrouve chez certains un seuil de 5% alors que pour d'autres il sera de 30%. L'évaluation de ce facteur reste donc difficile à identifier, d'une part du fait qu'un seuil n'a pas été clairement défini, et d'autre part car l'expression de ce marqueur varie en fonction du temps.

4. Valeurs pronostiques des principaux facteurs, résumé

Le **tableau 4** représente la valeur pronostique de ces principaux facteurs.

Prognostic marker*	Prognostic indication	Clinical and/or biological relevance	Evaluation method	Relation to <i>IGHV</i> gene mutation status
Clinical markers				
Rai staging (0-IV)	Low stage: low risk; high stage: high risk	Tumor burden	Physical examination and laboratory tests	High stage correlates to UM <i>IGHV</i> genes
Binet staging (A-C)	Low stage: low risk; high stage: high risk	Tumor burden	Physical examination and laboratory tests	High stage correlates to UM <i>IGHV</i> genes
LDT	Short LDT (< 6 months): high risk	CLL cell proliferation rate (disease aggressiveness)	Sequential absolute lymphocyte counts	
LDH serum level	High level: high risk	Tumor burden	LDH serum level	
B2M serum level	High level: high risk	Tumor burden	B2M serum level	
TK serum level	High level: high risk	CLL cell proliferation rate	TK serum level	Elevated serum TK correlates to UM <i>IGHV</i> genes
Genetic markers				
<i>IGHV</i> gene mutation status	M <i>IGHV</i> genes: low risk; UM <i>IGHV</i> genes: high risk	Presence or absence of somatic mutations in <i>IGHV</i> genes relates to CLL pathogenesis	<i>IGHV</i> gene sequencing	NA
<i>IGHV</i> gene stereotypy	Different depending on subset: subset 1: high risk; subset 4: low risk	Stereotyped B cell receptors indicate antigen selection in CLL pathogenesis	<i>IGHV</i> gene sequencing	Subset 1 patients carry UM <i>IGHV</i> genes, subset 4 carry M <i>IGHV</i> genes
Absence of known recurrent aberrations del(11q)	Low risk	Indicates other factors driving disease	FISH or microarray	M <i>IGHV</i> genes
del(13q)	Intermediate to high risk	Deregulation of <i>ATM</i> , <i>BIRC3</i> and/or other candidate genes	FISH or microarray	UM <i>IGHV</i> genes
del(17q) and <i>TP53</i> mutations (deleterious)	Low risk	Deregulation of <i>miR15a/16-1</i> and/or other candidate genes	FISH or microarray	M <i>IGHV</i> genes
Trisomy 12	High risk	Deregulation of <i>TP53</i> pathway and lost cell-cycle regulation	FISH, microarray and mutational screening	UM <i>IGHV</i> genes
Translocations	Intermediate prognosis	Unknown function/role	FISH or microarray	UM <i>IGHV</i> genes
Genomic complexity	High risk	Translocation of <i>BCL2</i> , <i>BCL3</i> or other genes to <i>IG</i> gene promoter region	FISH or cytogenetics	UM <i>IGHV</i> genes
<i>NOTCH1</i> mutations (activating)	High risk	Loss of cell cycle regulation promotes acquisition of novel aberrations	Microarray or cytogenetics	Some translocations, e.g. t(14;19) (q32;q13) correlate to UM <i>IGHV</i> genes
<i>SF3B1</i> mutations (deleterious)	Intermediate to high risk	Constitutively active <i>NOTCH1</i> promotes proliferation, e.g. through NF- κ B signaling	Mutational analysis	UM <i>IGHV</i> genes
<i>BIRC3</i> mutations (deleterious)	Intermediate to high risk	Truncated <i>SF3B1</i> unable to function in spliceosome machinery leads to aberrant splicing	Mutational analysis	No relation
Protein and RNA expression markers				
CD38 level	High level: high risk	Non-functional <i>BIRC3</i> leads to enhanced NF- κ B signaling through loss of negative regulation of IKK complex	Mutational analysis	UM <i>IGHV</i> genes
ZAP70 level	High level: high risk	High expression allows enhanced cell-cell interaction and/or enzyme activity	Flow cytometry	High protein level is correlated to UM <i>IGHV</i> genes
<i>LPL</i> level	High level: high risk	High expression due to enhanced Bcr signaling	Flow cytometry or RNA expression	High expression/protein level is correlated to UM <i>IGHV</i> genes
<i>CLLUI</i> level	High level: high risk	Function of <i>LPL</i> in CLL is unknown	RNA expression	High expression level is correlated to UM <i>IGHV</i> genes
Expression of miRNAs	Different indication depending on miRNA analyzed	Function of <i>CLLUI</i> is not known and there is no functional protein	RNA expression	High expression level is correlated to UM <i>IGHV</i> genes
		Several miRNAs have been found to regulate several genes previously known to be deregulated in CLL	mRNA expression	Certain prognostic markers are correlated to <i>IGHV</i> gene mutation status

CLL, chronic lymphocytic leukemia; LDT, lymphocyte doubling time; LDH, lactate dehydrogenase; B2M, β_2 -microglobulin; TK, thymidine kinase; *IGHV*, immunoglobulin heavy chain variable; M, mutated; UM, unmutated; LPL, lipoprotein lipase; NF- κ B, nuclear factor κ B; Bcr, B cell receptor; NA, not applicable.

*Prognostic markers stated in table are ordered as they appear in text. Subset 1 patients express *IGHV1/5/7* clan genes combined with *IGHV1-39/IGHV1D-39* genes, subset 4 patients express *IGHV4-34/IGHV2-30* genes.

Tableau 4 : Principaux marqueurs pronostiques décrits dans la LLC²⁹

V. Les anomalies cytogénétiques

La LLC est caractérisée par un nombre important d'anomalies cytogénétiques, plus de 80% des patients présentent une ou plusieurs anomalies cytogénétiques^{30,31}. En comparaison d'autres hémopathies B associées à des translocations équilibrées récurrentes, les anomalies les plus fréquemment observées dans la LLC sont des pertes et des gains de matériels chromosomiques. Ces délétions et gains sont de taille variable, allant d'une petite région jusqu'à un chromosome entier. Les anomalies les plus fréquentes sont la délétion (del) du bras long (q) du chromosome 13, la délétion du bras long du chromosome 11, la trisomie 12, la délétion du bras court (p) du chromosome 17, le gain du bras court du chromosome 2. Il existe également d'autres anomalies récurrentes comme les délétions 6q, 8p et 14q, et le gain 8q.

Un modèle hiérarchique a été proposé par Dohner *et al.* en 2000, mettant en évidence le bon pronostic de la del(13q) isolée, et le mauvais pronostic des del(11q) et del(17p). Ces résultats ont été confirmés par de nombreuses études^{29,31,32} (cf figure 2). Il existe cependant des anomalies dont l'impact pronostique est encore inconnu ou mal défini. Enfin, aucune de ces anomalies n'est spécifique de la LLC, pouvant être observées dans d'autres hémopathies malignes.

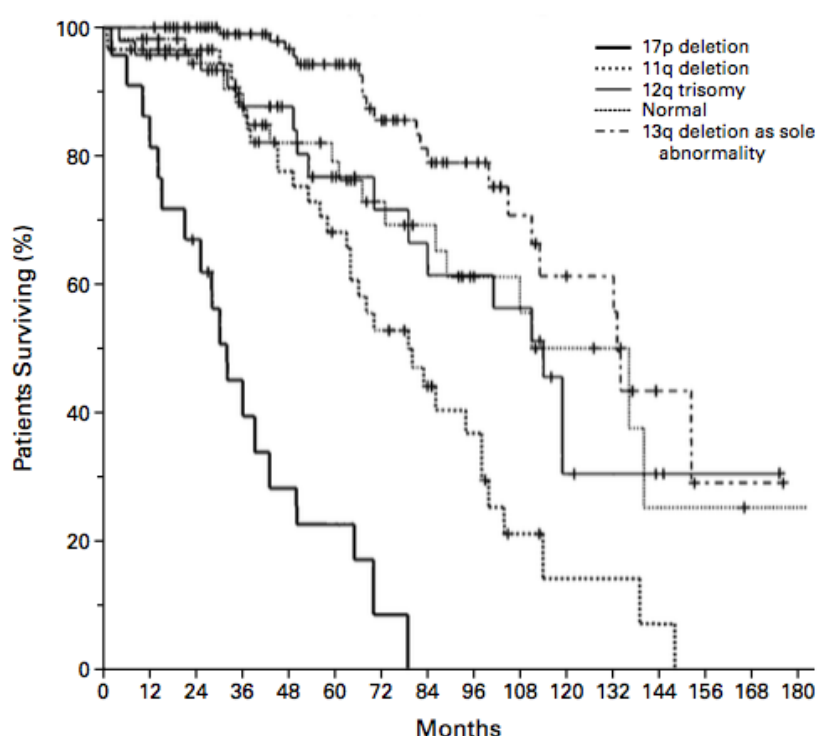


Figure 2 : Impact sur la survie globale de différentes anomalies cytogénétiques³¹

1. La délétion 13q

La délétion du bras long du chromosome 13 est l'anomalie la plus fréquemment retrouvée dans la LLC. Elle est identifiée chez 50 à 60% des patients LLC³¹, plus souvent chez les patients au stade A³³. La del(13q) est associée à un bon pronostic lorsqu'elle est présente de façon isolée^{31,34}.

Pour mettre en évidence la présence d'un ou plusieurs gènes important dans cette anomalie et dans la pathogenèse de la LLC, la région minimale de délétion (MDR, « Minimal Deleted Region ») a été recherchée. La MDR se définit par la plus petite région commune à un plus grand nombre de patients. Dans le cas de la del(13q), la MDR a été localisée en 13q14, et comprend deux micros-ARN, les miR-15a et miR-16-1, décrits comme délétés ou sous-exprimés dans la LLC^{35,36}. Ces deux microARN ont pour cible le gène *BCL-2*, codant la protéine anti-apoptotique de la famille du même nom³⁷. La délétion et/ou diminution de l'expression de ces deux micros-ARN via la délétion 13q14 entraîne la surexpression de *BCL-2* que l'on observe dans la LLC, décrite comme contribuant à la résistance des cellules de LLC à l'apoptose³³.

Plus récemment, afin d'évaluer l'impact de la MDR de la délétion 13q14, l'équipe de Dalla-Favera a développé une lignée de souris délétées pour les gène/microARN *DLEU2/miR-15a/miR-16-1*³⁸. L'analyse phénotypique a mis en évidence un développement de cellules B, des désordres lymphoprolifératifs, rappelant le phénotype de la LLC chez l'homme. Les auteurs ont attribué cette expansion de cellules B à la surexpression de *BCL-2*, conduisant à un environnement favorisant leur prolifération³⁸. En réalisant la même expérience en délétant une région plus importante comprenant plus de gènes (*DLEU1*, *DLEU7*, *RNASEH2B*), ils ont observé un développement tumoral comparable à celui de la LLC. Dans le cadre de la délétion 13q14, les miR-15a et miR-16-1 sont importants pour la pathogénicité de la LLC, mais d'autres gènes présents aux alentours de ces deux micros-ARN participent également au développement de la LLC³⁹.

Contrairement aux autres délétions qui vous seront présentées plus loin, la del(13q) est la seule retrouvée fréquemment de façon mono-allélique ou bi-allélique. Plusieurs études ont porté sur l'impact pronostique du statut mono ou bi-allélique, avec des résultats divers. Les hypothèses émises sont que la perte du second allèle pourrait être due à une instabilité génomique de cette région, ou encore un moyen à la cellule de s'assurer de la perte complète des micros-ARN *miR-15a* et *miR-16-1* ainsi que des gènes environnants, pour permettre l'expression de *BCL-2* par exemple. Il semblerait cependant que la perte du second allèle ne rende pas cette anomalie de plus mauvais pronostic⁴⁰.

2. La délétion 11q

La seconde anomalie la plus fréquemment retrouvée dans la LLC, dans environ 5% des stades A⁴¹ et 20% des stades B et C^{42,43}, est la délétion du bras long du chromosome 11. Cette anomalie est plus souvent associée avec un stade avancé de la maladie^{44,45}. Les patients avec del(11q) présentent des adénopathies plus importantes, un intervalle de temps raccourci entre le diagnostic et le premier traitement, ainsi qu'une survie globale plus courte⁴⁶.

La région minimale de délétion pour cette anomalie a été localisée en 11q22.3-q23.1, et comprend le gène *ATM* (« *Ataxia Telangiectasia-Mutated* »). Ce gène a été retrouvé muté dans 12% des cas de LLC, et environ 30% des LLC avec une délétion 11q22-23⁴⁷. Le gène *ATM* code pour une kinase jouant un rôle central dans la signalisation de réparation des dommages à l'ADN. Sa délétion et/ou mutation entraîne(nt) un défaut dans cette signalisation, conférant aux cellules une résistance à l'apoptose, par l'inhibition de l'apoptose dépendante de la protéine p53. *ATM* joue également un rôle en régulant le cycle cellulaire et en induisant l'apoptose en réponse à des cassures de l'ADN⁴⁸. La perte de fonction du gène, que ce soit par délétion ou mutation, conduit à une instabilité génomique pouvant être accrue dans les cellules lésées génétiquement et ne pouvant entrer en apoptose.

La del(11q) a également été décrite récemment en association avec des mutations du gène *SF3B1*^{19,34}, un facteur d'épissage des ARNm qui est développé dans la partie VI. Ces deux altérations pourraient donc interagir, permettant d'un côté des erreurs dans l'épissage des transcrits ARN via la mutation de *SF3B1*, et de l'autre un défaut dans l'apoptose via la perte de fonction du gène *ATM*.

3. La trisomie 12

La trisomie 12 est retrouvée chez environ 15% des patients LLC. Plusieurs travaux ont identifié cette anomalie comme un facteur de mauvais pronostic, en particulier lorsque celle-ci est associée à d'autres anomalies génétiques. Cependant, son impact clinique est encore controversé^{31,34}. L'incidence de cette anomalie ne varie pas en fonction du stade de la maladie ou de la progression en maladie réfractaire⁴⁴. L'impact pronostique de la trisomie 12 pourrait dépendre de la présence de marqueurs pronostiques supplémentaires. Cependant, une étude publiée en 2015 semblerait indiquer que si le pourcentage de cellules ayant une trisomie 12 est supérieur à 60%, le pronostic de cette anomalie est péjoratif⁴⁹. Récemment encore, la trisomie 12 a été décrite associée avec les mutations du gène *NOTCH1*, qui sera traité plus loin. Il a d'ailleurs été décrit que la mutation de *NOTCH1* chez les LLC avec trisomie 12 conférait un pronostic défavorable⁵⁰. La mutation de *NOTCH1* semblerait donc définir si la trisomie 12 est un facteur de bon ou de mauvais pronostic.

Aucune région minimale de gain n'a pu être définie de façon claire, et il n'a donc pas été possible d'identifier le ou les gènes impliqués dans la pathogenèse de la LLC via cette anomalie. Quelques hypothèses ont cependant été émises. En effet, le gène *MDM2* (codant la protéine anti-apoptotique responsable de la dégradation de la protéine p53), localisé en 12q13-15, est retrouvé surexprimé dans les LLC⁵¹. Une étude a par ailleurs observé que le locus du gène *MDM2* était retrouvé plus amplifié que d'autres sur le chromosome 12 chez des patients LLC⁵². L'amplification du gène *MDM2* pourrait entraîner sa surexpression.

4. La délétion 17p

La délétion du bras court du chromosome 17 est retrouvée dans un pourcentage plus faible des patients (environ 4 à 9%)^{31,44}. Cette anomalie est associée à un mauvais pronostic ainsi qu'à une maladie agressive ; en effet, on la retrouve chez environ 30% des patients réfractaires^{44,53}. C'est l'anomalie qui a le plus mauvais pronostic dans la LLC. La délétion 17p a des tailles variables, allant de la totalité du bras court, jusqu'à une région minimale de délétion localisée au niveau de la région 17p13⁵⁴. L'analyse des gènes présents en 17p13 a permis de mettre en évidence la présence du gène suppresseur de tumeur *TP53*.

Dans plus de 80% des LLC présentant une del(17p), l'autre copie du gène *TP53* est mutée, entraînant alors une perte de fonction complète de la protéine p53. Cette protéine, « gardienne de l'intégrité du génome », joue un rôle crucial dans toutes les cellules, agissant comme régulatrice du cycle cellulaire et de l'apoptose suite à des dommages à l'ADN. La perte de fonction de p53 rend les cellules plus résistantes aux traitements classiques comprenant des molécules induisant des dommages à l'ADN du fait de l'absence d'activité d'induction de l'apoptose modulée par p53.

Cette catégorie de patients est très difficile à traiter. En effet, la chimiothérapie classique induit une mort dépendante de p53. Ces patients avec une p53 non-fonctionnelle due à la délétion 17p et/ou la mutation du gène *TP53* seront réfractaires à la chimiothérapie^{55,56}.

5. Le gain 2p

Le gain du bras court du chromosome 2 (gain 2p), est une anomalie récurrente qui est retrouvée chez 1,9 à 28% des cas selon les cohortes d'études^{54,57-70}. Cette anomalie est associée à des facteurs de mauvais pronostic, comme la del(11q)^{64-66,68}, le statut non-muté des *IGHV*^{61,62,65,68}, l'expression de *ZAP70*^{65,68}. Le gain 2p a également été rapporté dans des LLC avec del(17p)⁶⁸, ce qui est confirmé dans l'étude de Forconi et al. où le gain 2p est trouvé chez 39% des LLC avec del(17p)⁶⁰.

Le gain 2p semble être une anomalie associée avec la progression de la maladie. Il a en effet été décrit comme augmentant le risque de transformation en syndrome de Richter⁶⁴. Enfin les courbes de survie des patients LLC indiquent que la présence de cette anomalie a un impact défavorable sur la survie globale^{60,63,64,70}.

La taille du gain 2p est variable, avec cependant pour la majorité des patients un gain d'une grande partie du bras court, allant jusqu'à sa totalité. Les premières études portant sur le gain 2p se sont focalisées sur l'analyse des gènes *MYCN*, *REL* et *BCL11A* principalement, qui sont trois oncogènes connus dans la LLC et localisés sur le 2p. En effet, le gène *MYCN*, membre de la famille des facteurs de transcription MYC, est amplifié dans les neuroblastomes ainsi que dans une large variété de tumeurs neuroectodermiques. De plus, dans les neuroblastomes, l'amplification de *MYCN* est le facteur de plus mauvais pronostic. Plus particulièrement dans la LLC, une surexpression de *MYCN* a été retrouvé chez les LLC avec gain 2p par rapport aux LLC sans gain 2p^{58,62}. Dans une autre étude, le gain de *MYCN* dans la LLC entraînait une survie plus courte⁶³. Il semblerait donc que le gain de *MYCN* ait un rôle dans la pathogenèse de la LLC.

Concernant *REL*, ce gène code une des 5 sous-unités activatrices de la voie NF-KB et agit en tant que facteur de transcription régulant l'expression de gènes intervenant dans la survie cellulaire, l'apoptose, ainsi que la maturation des lymphocytes B. Il joue d'ailleurs un rôle dans la survie et la prolifération des lymphocytes B. Le gène *REL* est amplifié dans des lymphomes B (environ 50% des cas), incluant les lymphomes de Hodgkin. Dans la LLC, le gain de *REL* est associé à un statut non-muté des gènes *IGHV*⁶².

Le gène *BCL11A* est également impliqué dans la translocation chromosomique t(2;14)(p16;q32), qui entraîne la juxtaposition de « l'enhancer » des immunoglobulines avec ce gène, conduisant à la surexpression de *BCL11A*^{71,72}. Cette translocation est rare, mais récurrente dans les hémopathies B, incluant la LLC et le SLL, ainsi que les leucémies aiguës lymphoblastiques et les lymphomes non-Hodgkiniens.

Au niveau moléculaire, il a été identifié en 2007 une région minimale de gain par SNP-array⁵⁹. Cette région minimale de gain de 3,55 Mb comprenait 8 gènes dont les deux oncogènes *BCL11A* et *REL*. Cette région minimale a par la suite été affinée à l'aide d'une seconde étude réalisée sur un nombre de patients plus important, avec des puces plus performantes⁵⁴. La région décrite par Edelmann (cf **Figure 3**), de 1,909 Mb incluait 9 gènes (*BCL11A*, *REL*, *PAPOLG*, *AHSA2*, *PEX13*, *PUS10*, *USP34*, *XPO1* et *KIAA1841*). Il est à noter que dans cette étude, contrairement à d'autres, le gain 2p n'avait aucune influence sur la PFS ou la survie globale.

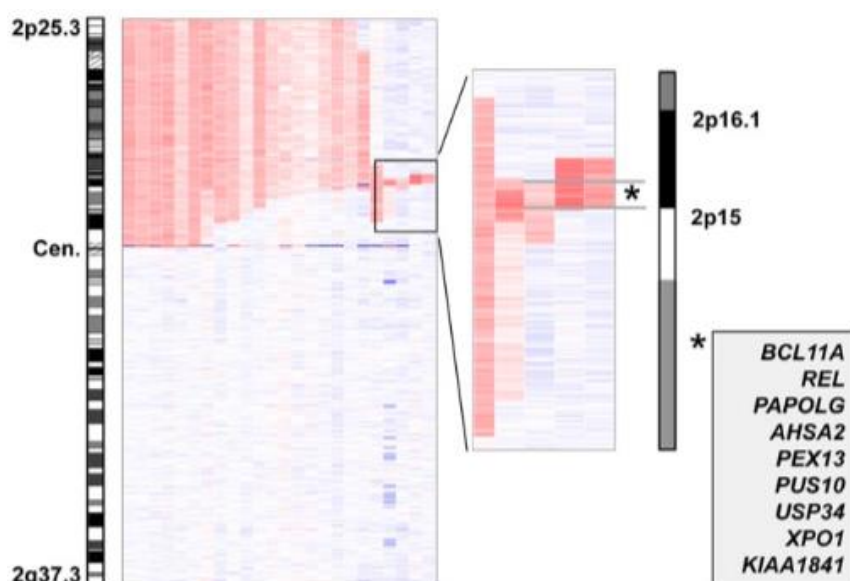


Figure 3 : Identification d'une région minimale de gain sur le 2p⁵⁴

A l'heure actuelle, le gain 2p est une anomalie peu caractérisée. La valeur pronostique de cette anomalie n'est pas complètement définie, et bien qu'une région minimale comprenant un nombre limité de gènes ait été identifiée, aucune étude fonctionnelle n'a permis d'identifier clairement un (ou plusieurs) gène(s) candidat(s) pour cette anomalie. Cependant, si l'on se réfère aux différentes études portant sur le 2p, au moins quatre gènes pourraient jouer un rôle important dans la LLC, les oncogènes *MYCN*, *REL* et *BCL11A*, et le gène *XPO1*, qui a été décrit comme muté de façon récurrente dans la LLC, et sur lequel je vais revenir.

6. La délétion 14q

La délétion du bras long du chromosome 14 est une anomalie récurrente mais rare dans la LLC, présente chez environ 2% des patients⁷³. On retrouve également cette anomalie dans d'autres hémopathies B. Cette anomalie étant rare, peu d'études ont porté sur sa caractérisation. Une analyse réalisée sur 23 patients atteints de leucémies et de lymphomes non-Hodgkiniens (avec pour la moitié des patients un diagnostic de LLC ou de LLC atypique) avait mis en évidence l'association entre la del(14q) dans la LLC et la trisomie 12, et un statut non-muté *IGHV*. Les auteurs avaient également mis en évidence des points de cassure récurrents en 14q32.1q32.3 chez la moitié des cas, impliquant le gène *ZFP36L1* au niveau centromérique⁷⁴. Ces points de cassure récurrents ont d'ailleurs pu être confirmés dans une cohorte plus importante, où la présence de la del(14q) chez des patients LLC avec tri12 était associée à une durée entre le diagnostic et le premier traitement plus courte⁷³. De plus, dans

cette dernière étude, la présence de la del(14q) chez des patients LLC avec trisomie 12 conférait un pronostic défavorable.

Aucun gène candidat n'a encore été identifié dans cette région. Une des hypothèses développées par Pospisilova et *al.* était que la délétion rapprochait deux gènes, dont l'enhancer du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (*IGH*), entraînant ainsi l'activation transcriptionnelle du gène partenaire. Cependant, l'analyse de plusieurs gènes localisés au niveau du point de cassure n'a pas révélé de changement d'expression. Une autre hypothèse impliquait la perte d'un ou plusieurs micros-ARN. Mais aucune investigation supplémentaire n'a permis de valider l'une ou l'autre de ces hypothèses.

VI. Les anomalies génétiques

Avec l'avènement des nouvelles technologies de séquençage à haut débit (NGS « Next Generation Sequencing »), la caractérisation de la LLC a pris un nouvel essor. En effet, de façon comparable aux anomalies cytogénétiques, la détection de nouvelles mutations, la corrélation des mutations avec les facteurs pronostiques déjà existant, ou encore avec la survie globale, offrent de nouvelles informations d'une part, pour la compréhension de l'oncogenèse, et d'autre part pour affiner les facteurs pronostiques (**cf figure 4**). La valeur pronostique de ces nouvelles mutations sont en cours d'analyse, et nécessite d'être validée par plusieurs études.

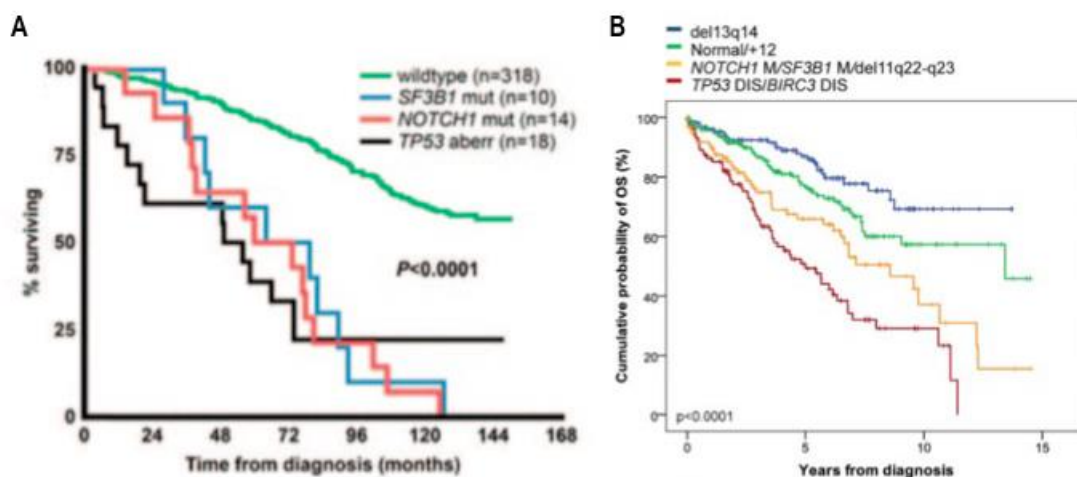


Figure 4 : Exemple d'impact sur la survie globale de différentes mutations génétiques dans la LLC^{29,75}. M et mut : mutations; aberr : aberration ; DIS : disruption ; OS : Overall Survival

Dès 2011, les technologies de « whole genome sequencing » ou « whole exome sequencing » ont été appliquées à la LLC. Il a alors été découvert qu'il n'existait pas d'événement mutationnel unique favorisant le développement de la LLC. En effet, dans les différentes études, les gènes n'étaient pas retrouvés mutés dans plus de 20% des cas^{34,76,77}. Les gènes les plus fréquemment mutés interviennent principalement dans la régulation de 5 processus biologiques (cf **figure 5**). Ces gènes sont impliqués dans des voies de réparation des dommages à l'ADN et dans le contrôle du cycle cellulaire (avec les mutations des gènes *ATM* et *TP53* par exemple), la voie de signalisation Notch (*NOTCH1* et *FBXW7*), l'inflammation (*MYD88*, *DDX3X*, *MAPK1*), la voie Wnt ou encore les étapes d'épissage de l'ARNm et leur export (*SF3B1*, *DDX3X*, *XPO1*). Parmi les gènes les plus fréquemment mutés dans la LLC, on retrouve *TP53*, *SF3B1*, *ATM*, *NOTCH1*, *XPO1* et *MYD88*.

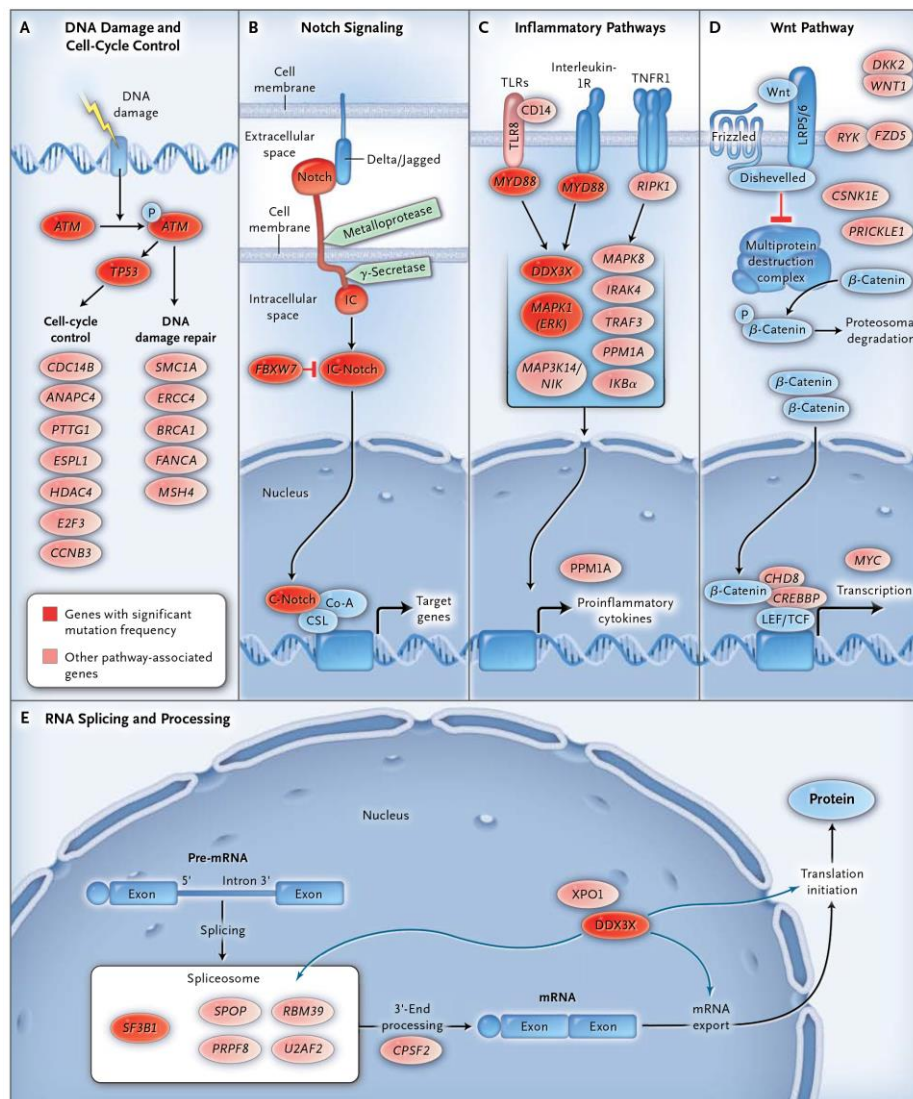


Figure 5 : Principaux processus biologiques altérés par des mutations génétiques³⁴

1. *SF3B1*

SF3B1, gène localisé en 2q33.1, code pour la protéine « Splicing factor 3b subunit 1 » qui est un membre du complexe d'épissage des ARNm. Cette protéine joue un rôle dans la maturation des ARNm immatures par l'excision des introns présents. L'épissage des ARNm est une étape importante lors de la maturation car elle permet la formation de transcrits alternatifs dérivant du même gène, via l'excision de certains exons lors de l'épissage. *SF3B1* est retrouvé muté dans la LLC entre 10 et 15% des cas selon les études. Les mutations de ce gène sont exclusivement localisées au niveau des domaines HEAT, domaines catalytiques de la protéine (cf figure 6). Une étude a d'ailleurs mis en évidence que les mutations de *SF3B1* affectent l'épissage des ARNm via l'étude des différents transcrits des gènes *BRD2* et *RIOK3*³⁴. *SF3B1*mut a été décrit comme associé à la délétion 11q ainsi qu'aux mutations d'*ATM*, suggérant ainsi un effet coopératif, ainsi qu'au statut non-muté *IGHV* et à l'expression de *ZAP70*. Les mutations de *SF3B1* sont associées à un mauvais pronostic, une progression de la maladie et une survie plus courte⁷⁸⁻⁸⁰. Contrairement aux mutations de *NOTCH1* qui seront détaillées plus loin, les mutations de *SF3B1* n'ont pas été décrites comme étant associées à un risque de transformation en syndrome de Richter⁷⁸. *SF3B1* est également muté dans des syndromes myélodysplasiques, sur les mêmes codons mais avec des mutations différentes⁸¹.

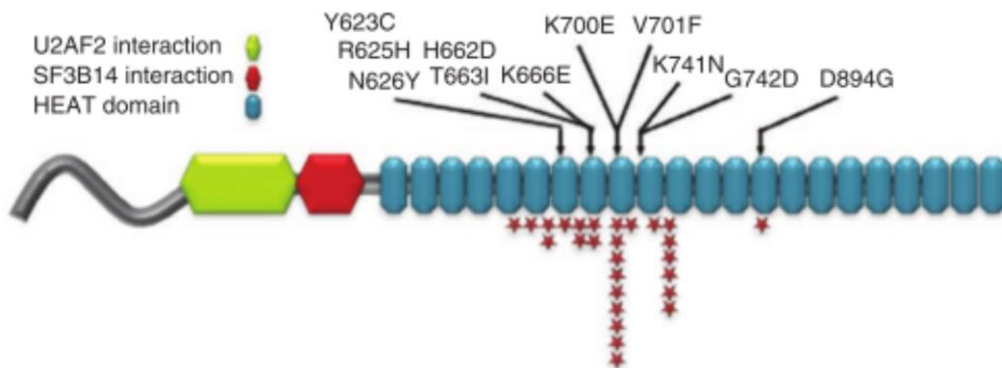


Figure 6 : Mutations affectant le gène *SF3B1* dans la LLC⁷⁷. Représentation schématique de la structure primaire de la protéine *SF3B1* humaine. Les étoiles représentent la fréquence des différentes mutations observées dans l'étude.

2. *NOTCH1*

Le gène *NOTCH1* est retrouvé muté chez 4-12% des patients LLC^{19,82,83}. Ce gène code pour le récepteur transmembranaire impliqué dans la voie de signalisation Notch. Cette voie permet la régulation de l'expression de divers gènes comme *c-MYC*, *TP53*, ainsi que des gènes également

impliqués dans la voie NF- κ B comme *RUNX1* et *GATA2*. La voie Notch est impliquée dans la croissance, la différenciation cellulaire, ainsi que dans l'apoptose au cours du développement. Les mutations affectant *NOTCH1* vont entraîner une perte du domaine PEST de la protéine empêchant ainsi sa dégradation et la stabilisant, conduisant à une activation constitutive⁷⁶ de la voie Notch qui va induire une résistance à l'apoptose, ainsi que l'augmentation des signaux de survie de la cellule⁸⁴. Plusieurs types de mutations peuvent affecter ce gène, on notera cependant que dans environ 80% des cas de patients LLC mutés pour *NOTCH1*, la mutation retrouvée est une délétion de 2 paires de bases au niveau du domaine PEST de la protéine (C.7544-7545delCT)^{82,85}. On retrouve les mutations de *NOTCH1* dans des formes agressives de LLC avec un risque plus élevé de transformation en syndrome de Richter, ayant des facteurs de mauvais pronostic comme le statut non-muté des *IGHV*, la trisomie 12 et l'expression de ZAP70^{80,86,87}.

3. *MYD88*

MYD88 code pour la protéine « Myeloid Differentiation primary response 88 », impliquée dans la signalisation des récepteurs « Toll-like » (TLR). Cette voie joue un rôle central dans la réponse immunitaire des cellules B indépendante du BCR. Après activation des récepteurs « Toll-like » par un antigène, une transduction du signal intracellulaire va se produire faisant intervenir la protéine MYD88 qui va être recrutée. Une cascade de protéines sont alors activées faisant intervenir les protéines IRAK1/2 et TRAF6, conduisant à la phosphorylation de IKK β , un inhibiteur de la voie NF- κ B, qui une fois phosphorylé va entraîner sa dégradation, activant ainsi des facteurs de transcription de la voie NF- κ B⁸⁸. Dans la LLC, une seule mutation de *MYD88* a été identifiée, chez 1-5% des patients, la mutation L265P^{19,76}. Cette mutation, activatrice, va entraîner une phosphorylation de MYD88, conduisant par la suite à une activation constitutive de la voie NF- κ B. La mutation de *MYD88* a été associée à un statut muté des *IGHV* et la présence de la délétion 13q isolée, facteurs de bon pronostic^{19,83,89}. De plus, la mutation de *MYD88* a été associée à un âge des patients LLC inférieur à 50 ans, contrairement aux autres mutations des gènes *SF3B1*, *NOTCH1* et *TP53*⁸⁸. *MYD88* est également muté dans la maladie de Waldenström et le lymphome B diffus à grandes cellules où l'on retrouve la même mutation que dans la LLC^{90,91}.

4. *CRM1* (“Chromosomal Region Maintenance 1”)/*XPO1* (“exportine 1”)

Je me suis particulièrement intéressé à ce gène, que j’appellerai par la suite *XPO1*, au cours de la 3^{ème} partie de ma thèse, et sa fonction sera détaillée dans le Chapitre III. *XPO1* code pour une exportine qui joue un rôle majeur dans l’export nucléocytoplasmique⁹².

Des mutations affectant ce gène sont décrites dans la LLC chez 2-8% des cas selon les séries^{76,83,86,93,94}. Un codon est principalement muté, le codon E571, avec différentes mutations, E571K, E571G, E571V, E571Q, E571A entraînant le changement d’un acide aminé polaire, l’acide glutamique, en acide aminé apolaire ou basique (lysine, glycine, valine, glutamine, alanine). Le fait que toutes les mutations affectant *XPO1* soient localisées au niveau du même codon et dans une région très conservée entre les espèces suggère que ce sont des mutations activatrices, entraînant une augmentation de l’activité de *XPO1*⁹⁴. Deux études ont également identifié les mutations V520A, V565I⁸⁶ et D624G⁸³, mais chez un seul patient pour chacune. Les mutations de *XPO1* ont été décrites comme associées à un statut non-muté des *IGHV* ainsi qu’à l’expression de *ZAP70* dans diverses études^{83,86,94} suggérant que les mutations de ce gène pourraient être associées à un pronostic défavorable.

VII. La notion de clonalité

Par la cytogénétique, on sait depuis de nombreuses années que d’une part la LLC peut présenter des anomalies clonales et des anomalies sous-clonales (avec la possibilité que différentes anomalies soient dans des clones distincts), et que d’autre part il existe une évolution clonale au cours du temps, avec apparition d’anomalies additionnelles, que ce soit au cours de la progression « naturelle » de la maladie, ou après traitement. Grâce au NGS, on a aussi pu identifier des mutations géniques présentes dans toutes les cellules tumorales, ou dans un/des sous-clone(s). On peut ainsi reconstruire l’évolution de la maladie, en considérant que l’anomalie présente dans toutes les cellules est celle qui est apparue la plus précocement, contrairement à d’autres anomalies minoritaires⁹⁵. L’étude de Landau *et al.* a d’ailleurs identifié les mutations des gènes *MYD88* ou encore *NOTCH1* ou *XPO1* comme précoces, alors que les mutations de *TP53*, *ATM* ou *FBXW7* sont tardives (cf **Figure 7**).

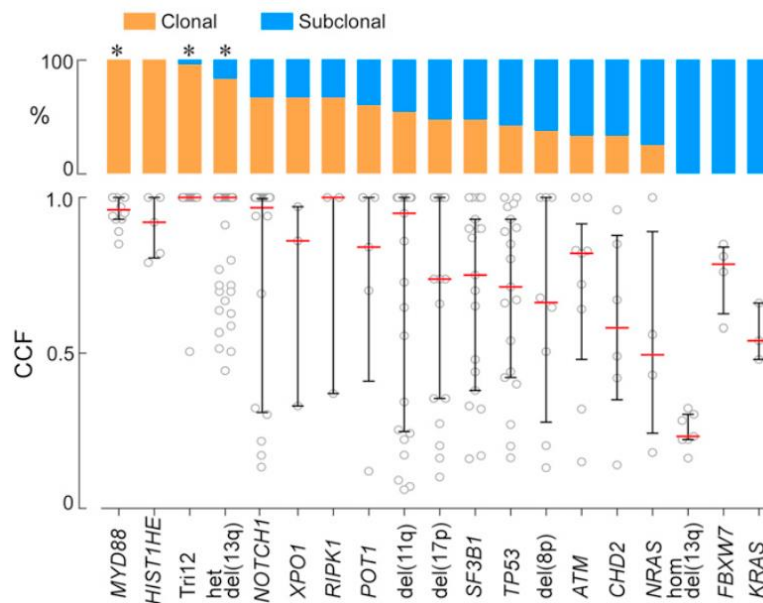


Figure 7 : Identification de mutations précoces ou tardives dans la LLC⁹⁵. CCF : Cancer Cell Fraction.
Chaque rond correspond à un individu.

Un autre travail a pu suivre au cours du temps l'évolution clonale des mutations de trois patients LLC par WGS. Les auteurs ont observé une hétérogénéité clonale des mutations en fonction des patients. L'étude longitudinale de la clonalité a mis en évidence qu'un phénotype moléculaire stable est associé d'un point de vue clinique à une faible progression de la maladie et une bonne réponse au traitement. De façon contraire, l'apparition ou l'augmentation des sous-clones est associée à une résistance au traitement⁹⁶. On s'aperçoit que des anomalies présentes dans des sous-clones peuvent avoir un impact important et vont devoir être prises en compte. En effet, d'autres travaux ont mis en évidence que le traitement de patients LLC chez lesquels des mutations de *TP53* étaient préexistantes dans un sous-clone entraîne après rechute une expansion du clone *TP53* muté qui devient plus difficile à traiter⁹⁷.

VIII. L'origine de la LLC

Nous avons pu voir précédemment que la LLC est une maladie très hétérogène d'un point de vue cytogénétique et génétique. A l'exception de la délétion 13q qui est présente chez 50 à 60% des patients, on ne retrouve pas d'anomalies cytogénétiques ou géniques qui soient présentes chez plus de 20% des patients. Malgré les nouvelles techniques de séquençage à haut débit qui ont mis en évidence des mutations impliquant des gènes jouant des rôles clés pour la survie des cellules, aucun événement

pouvant être à l'origine de la LLC n'a été identifié. Cette pathologie étant une maladie clonale, cela suggère que son développement provient de l'altération d'une cellule. La première étude impliquant les cellules souches hématopoïétiques (HSC « Hematopoietic Stem Cell ») comme étant « la cellule » à l'origine de la LLC a été réalisée en 1997⁹⁸. Les auteurs s'étaient focalisés sur l'étude de patients LLC avec une trisomie 12 ou une délétion du gène Rb (Rétinoblastome) détectée par FISH (« Fluorescent *In Situ Hybridization* »). Ils avaient par la suite trié les cellules CD34+ à partir du sang et de la moelle osseuse de patients pour rechercher l'anomalie présente dans le clone leucémique chez les cellules progénitrices. Ils ont ainsi mis en évidence que chez certains patients, l'anomalie présente dans le clone leucémique de LLC est également présente dans les cellules progénitrices, à des pourcentages élevés (pouvant aller jusqu'à 80% avec une pureté très élevée de l'ordre de 98%). Il a fallu attendre 2011 pour qu'une nouvelle étude soit publiée mettant en avant le fait que les HSC peuvent être à l'origine de la LLC⁹⁹. Les auteurs ont réalisé des xénogreffes des HSCs de patients LLC dans des souris immunodéficientes. Ils ont pu observer par la suite le développement de cellules pro-B exprimant le CD5 et possédant un phénotype de type MBL/LLC. De plus, l'analyse des réarrangements des *IGHV* a montré des réarrangements similaires à ceux du clone LLC des différents donneurs. Cependant, les anomalies génomiques présentes dans les cellules de LLC des donneurs n'ont pas été retrouvées dans les cellules possédant le phénotype MBL/LLC chez les souris, suggérant que ce type d'anomalie génomique apparaît secondairement dans le développement de la LLC. De plus, l'identification de réarrangements *IGHV* identiques chez la souris et les patients suggère qu'un antigène sélectionne les cellules pré-leucémiques pour un possible développement de la LLC par la suite.

IX. Le traitement des LLC

Suite à l'identification fortuite des patients LLC par une simple prise de sang, la prévalence des LLC de stades Binet A ou Rai 0 a augmenté. Ces stades de la maladie ne nécessitent pas de traitement immédiat, ils sont suivis de façon régulière (tous les 6 mois à un an), avec une prise de sang pour surveiller entre autres la lymphocytose, et un examen clinique, afin de déceler un éventuel envahissement d'aires ganglionnaires, indiquant la progression de la maladie. En effet, des études ont montré que le traitement de cette catégorie de patients avec des agents alkylants ne prolongeait pas la survie¹⁰⁰.

Il est important de prendre en compte les paramètres clinico-biologiques et les facteurs pronostiques de chaque patient avant de décider ou non de traiter celui-ci, avec un traitement adapté à ses caractéristiques.

Avant de décider de traiter un patient LLC, et de choisir également le traitement adéquat, il est recommandé d'évaluer différents critères¹⁰¹ :

- Le stade clinique (Binet ou Rai) du patient
- Les symptômes du patient
- L'état physique du patient
- La génétique du patient, anomalies cytogénétiques et mutations de gènes dont la valeur pronostique est connue
- S'il ne s'agit pas d'une première ligne de traitement, le type de réponse lors du précédent traitement

Un algorithme est d'ailleurs renouvelé de façon annuelle en fonction des nouveaux traitements acceptés en clinique, mais également des avancées dans les connaissances de la physiopathologie de la LLC (**cf tableau 5**)¹⁰¹. Les patients « go go » sont définis par une bonne condition physique en accord avec le CIRS (« Cumulative Illness Rating Scale »).

CLL first line treatment				CLL second line treatment			
Stage	Fitness	del(17p) p53mut	Therapy	Response to First-Line Therapy	Fitness	Therapy	
Binet A-B, Rai O-II, inactive	Irrelevant	Irrelevant	None			Standard	Alternatives (trials)
Active disease or Binet C or Rai III-IV	Go go	No	FCR (BR above 65 years?)	Refractory or progress within 2 years	Go go	Ibrutinib, A-Dex, FA, FCR, → Allogeneic SCT (?)	Lenalidomide, BR, (other kinase inhibitors, ABT-199)
		Yes	Ibrutinib, Idelalisib+Rituximab (Allogeneic SCT)		Slow go	Change therapy (include in trial)	Ibrutinib, Idelalisib + Rituximab, Alemtuzumab for del(17p), ABT-199, FCR-lite, BR, lenalidomide, ofatumumab, HD rituximab
	Slow go	No	Chlorambucil + Obinutuzumab (GA-101) or + Rituximab or + Ofatumumab				
		Yes	Ibrutinib, Alemtuzumab, HD Rituximab or Ofatumumab	Progress after 2 years	All	Repeat first-line therapy	

Tableau 5 : Traitements des patients LLC¹⁰¹. A : Alemtuzumab ; R : Rituximab ; O : Ofatumumab ; F : Fludarabine ; C : Cyclophosphamide ; CLB : Chlorambucil ; BR : Bendamustine + Rituximab ; HD : High-Dose ; SCT : Stem Cell Transplantation.

Comme on peut le voir sur ce tableau, différents traitements sont possibles pour les patients, en fonction des caractéristiques de leur maladie.

A ce jour, l'approche thérapeutique permettant une rémission à long terme, voir une guérison, est la transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques (HSCT « Hematopoietic Stem Cell Transplantation »). Il est observé une survie sans progression de l'ordre de 5 ans, la plus longue par rapport aux autres traitements actuels. Cependant, malgré une durée de vie allongée, tous les

patients LLC ne sont pas éligibles pour une transplantation. Différents critères sont pris en compte^{102,103} :

- La transplantation est recommandée chez les sujets jeunes, ayant de meilleures chances d'accepter le greffon
- Les patients dont le temps entre le diagnostic et le premier traitement est inférieur à 12 mois, indiquant une maladie progressive et agressive
- Sont éligibles à une HSCT les patients LLC dont la première ligne de traitement a été un échec, avec développement d'une résistance à la chimiothérapie. Classiquement, la première ligne de traitement consiste en une cure de RFC (constituée de Rituximab, de fludarabine et de cyclophosphamide, que je traiterai dans le paragraphe suivant). On retrouve le développement de chimiorésistance à ce type de traitement à base d'agent alkylant plus particulièrement chez les patients présentant une altération de *TP53* (del(17p) +/- mutations de *TP53*).

En plus de ces critères, il est nécessaire d'identifier un donneur ayant une compatibilité suffisamment élevée pour minimiser le risque de rejet du greffon par le patient LLC. Ce traitement est donc adapté pour un nombre relativement faible de patients. Les caractéristiques d'une maladie agressive sont définies par la présence de facteurs de mauvais pronostic¹⁰² (del(17p), del(11q), *IGHV* non muté, ZAP70 et CD38 positifs).

Comme dit précédemment, le traitement le plus couramment utilisé en première ligne est la tri-thérapie RFC. Ce traitement combine un agent alkylant de l'ADN, la cyclophosphamide (à noter que d'autres existent et sont également utilisés comme le chlorambucil, la bendamustine). Le second agent est un analogue de la purine, la fludarabine (il en existe également d'autres comme la pentostatine, la cladribine). Les analogues de purine vont inhiber la synthèse de l'ADN en interférant avec la DNA polymérase et la ribonucléotide réductase. Ces deux agents vont induire une apoptose des cellules via une dérégulation de la machinerie mitotique qui est dépendante de p53¹⁰⁴. Ce type de traitement n'est pas efficace chez les patients présentant des altérations de la protéine p53. De plus, elle engendre une lymphopénie T qui peut conduire au développement d'infections. Plus encore, la lymphopénie T va également diminuer l'approche immunothérapeutique engendrée par le traitement avec le rituximab dans le cadre de cette tri-thérapie. En effet, le dernier composé de cette thérapie consiste en l'ajout d'un anticorps anti-CD20, le rituximab (d'autres anticorps anti-CD20 ont également été développés plus récemment, l'Ofatumumab ou encore l'Obinutuzumab par exemple). Les cellules LLC exprimant le CD20, c'est en prenant avantage de cette caractéristique que le développement d'un anticorps monoclonal a été décidé. Le rituximab fut le premier anticorps monoclonal anti-CD20 développé. Son efficacité clinique démontrée, il a été autorisé comme traitement de la LLC entre autres. Le traitement

par RFC donne de bons pourcentages de réponse de l'ordre de 70% avec une survie globale sur 3 ans de 38%¹⁰⁵. Un autre traitement possible consiste en un anticorps recombinant anti-CD52, l'alemtuzumab, avec un stéroïde, le méthylprednisolone qui permet d'obtenir d'après une étude un pourcentage de réponse supérieur à 80% et une médiane de survie de 3 ans¹⁰⁶. D'autres traitements sont également utilisés chez les patients ne présentant pas de del(17p), comme la combinaison bendamustine avec le rituximab ou alemtuzumab.

Certaines des drogues ciblent le BCR et les protéines en aval dans sa signalisation, qui semblent jouer un rôle important dans la survie des cellules de LLC^{107,108}. Le mode d'action de ces nouvelles molécules consistent à inhiber la signalisation du BCR ce qui va conduire à une inhibition de l'interaction des cellules leucémiques avec le microenvironnement. Il est alors observé une augmentation de la lymphocytose due à la libération dans le sang des cellules de LLC présentes dans les différents microenvironnements. Les principales cibles sont :

- La « Bruton Tyrosine Kinase » Btk, ciblée par l'Ibrutinib en agent oral. La Btk permet l'activation de voies de survies comme NF- κ B et MAP kinase par l'activation des protéines de la famille Src. Cependant, des résistances à l'Ibrutinib ont été décrites. Il a en effet été observé l'apparition de mutations des gènes *BTK* et *PLCgamma2* après traitement par Ibrutinib chez 6 patients LLC devenus résistants à ce traitement¹⁰⁹. A l'heure actuelle, des combinaisons de l'Ibrutinib avec l'Idelalisib ou de l'Ibrutinib avec un BH3-mimetics l'ABT-199 sont actuellement testées^{110,111}.
- La « Phosphatidylinositol 3-kinase » PI3K, ciblée par l'Idelalisib (également connu sous le nom de CAL-101 ou GS-1101), aussi administré sous forme orale et qui de façon intéressante induit l'apoptose dans les cellules de LLC sans affecter les lymphocytes T ou les cellules NK des patients¹⁰¹.
- Les kinases Src et Abl, ciblées par le Dasatinib qui a été décrit *in vitro* comme induisant l'apoptose des cellules de LLC¹¹². Un essai clinique a testé la combinaison Dasatinib/Fludarabine où il a été observé une diminution de la taille des ganglions lymphatiques mais peu d'effet sur les LLC réfractaires à la fludarabine¹¹³.
- La kinase Syk (« Spleen Tyrosine Kinase »), ciblée par le Fostamatinib. Ce traitement induit l'apoptose des cellules par inhibition de la signalisation du BCR.

Plusieurs combinaisons sont actuellement à l'essai avec Idélalisib + Bendamustine ou Fludarabine ou Chlorambucile + Rituximab, ou encore Ibrutinib + Rituximab. Les résultats sont très prometteurs avec des pourcentages de réponses élevés.

Les membres de la famille Bcl-2 sont des acteurs clés de la régulation de l'apoptose dans une cellule. Dans la LLC, une dérégulation de l'expression des protéines de cette famille est observée. Avec pour exemple la del(13q) où la perte des deux microARN miR-15a et miR-16-1 vont conduire à une surexpression de Bcl-2. Le gène pro-apoptotique *BAX* est également sous-exprimé par l'inhibition de l'activité de p53. Différentes molécules ciblant certains de ces membres ont été développées. Parmi les plus connues et les plus prometteuses, on retrouve l'ABT-263 (Navitoclax) et l'ABT-199 (Venetoclax)^{114,115}. A noter que ces deux drogues sont administrées par voie orale. La première molécule a une haute affinité pour plusieurs membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dont Bcl-2, Bcl-Xl et Bcl-w. Cependant, les plaquettes étant affectées, avec des patients présentant de sévères thrombocytopénies, cela a conduit à diminuer les doses¹¹⁶. Les essais sont toujours en cours pour évaluer l'efficacité de ce composé. En parallèle, un inhibiteur plus spécifique de Bcl-2 a été développé, nommé ABT-199 ou encore « BH3-mimetic ». Ce second composé contrairement à l'ABT-263 n'affecte pas les plaquettes¹¹⁵. De plus, cette même étude réalisée chez 3 patients LLC réfractaires, a montré une lyse tumorale après une seule dose d'ABT-199, suggérant un rôle très prometteur de cette molécule pour une possible future thérapie¹¹⁵.

Il est important de souligner qu'à ce jour, la LLC est toujours incurable, même si la durée de vie des patients LLC a été allongée grâce au développement de nouvelles thérapies. Des essais cliniques sont continuellement réalisés, en utilisant des molécules ciblant de cibles thérapeutiques nouvellement identifiées, ou en évaluant l'efficacité de la combinaison de certaines molécules en fonction des caractéristiques des patients.

Il est également important de continuer à étudier la physiopathologie de la LLC afin d'identifier les facteurs à l'origine de son développement et de sa progression. Une meilleure compréhension de cette maladie permettra de mieux la traiter, avec l'identification possible de nouvelles cibles thérapeutiques. De plus, ces connaissances pourront être appliquées à d'autres hémopathies malignes et cancers solides.

Chapitre II. La mort cellulaire programmée

I. Généralités

Pour avoir un bon fonctionnement, l'organisme doit finement réguler sa prolifération, sa différenciation, ainsi que sa mort cellulaire. La mort cellulaire programmée (MCP) est un mécanisme crucial pour la survie d'un organisme, son homéostasie cellulaire, en cours de développement, au stade embryonnaire ou à l'âge adulte. En l'occurrence, durant le développement embryonnaire *in utero*, on observe par exemple une MCP contrôlée au niveau des mains pour permettre la formation des doigts. La MCP est également importante tout au long de la vie de l'organisme, comme par exemple pour le renouvellement de la paroi intestinale ou encore des cellules du sang^{117,118}. La MCP intervient alors pour tuer et éliminer les cellules immunitaires reconnaissant des cibles du soi, afin que celles-ci ne puissent se diriger contre l'organisme lui-même.

La MCP est un des processus physiologiques les plus étudiés du fait de son altération dans diverses pathologies tels que les cancers, les maladies auto-immunes ou neurodégénératives^{117,118}. La vie d'une cellule dépend en effet de la balance entre des facteurs de survie et de mort. Si on prend l'exemple des cancers, où la cellule devrait entrer dans un processus de MCP lors d'un traitement chimiothérapeutique, on observe une inhibition de la MCP du fait de sa dérégulation. Dans le cas de la LLC, nous avons pu voir précédemment que les cellules tumorales surexpriment la protéine anti-apoptotique Bcl-2. L'origine de cette surexpression vient en grande partie du fait que chez 50 à 60% des patients LLC, il est observé une délétion des micros-ARN miR-15a et miR-16-1 décrit comme inhibant l'expression de *BCL-2*. La perte de ces micros-ARN va ainsi permettre à la cellule de restaurer et surexprimer *BCL-2*, conduisant à une augmentation de la survie cellulaire³⁵⁻³⁷.

Les cellules cancéreuses, pour éviter d'entrer dans un mécanisme de mort, peuvent à la fois inhiber l'activité de certaines protéines en les dérégulant « transcriptomiquement », ou encore les inactiver par délétion ou mutation. C'est le cas de la délétion/mutation du gène *ATM* dans la LLC, ou encore de la délétion/mutation du gène *TP53* qui est observée dans une large variété de cancers¹¹⁹. Par ailleurs, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), considère que l'une des principales causes de mortalité dans les pays occidentaux est due à des altérations de la MCP. Alors qu'on retrouve une inhibition de l'apoptose dans les cancers, on retrouve dans l'ischémie et la neurodégénérescence un excès de MCP. C'est pourquoi la MCP, tout comme la régulation du cycle cellulaire et la prolifération, sont considérées au même titre comme des processus physiologiques régulant la cellule.

II. Définition

Après initiation de la MCP, que ce soit par un stimulus extrinsèque ou intrinsèque, la cellule va s'engager dans un processus réversible jusqu'à ce qu'elle atteigne une étape irréversible, aussi appelée « point de non-retour ». Cette étape est représentée soit par l'activation massive de protéases liées à la mort (comme par exemple les caspases ou les calpaïnes), la perte du potentiel de la membrane mitochondriale, la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, et/ou l'externalisation à la membrane plasmique de la phosphatidylserine (signal de phagocytose). Un événement unique ne peut être retenu comme signal de non-retour. En l'absence d'un événement spécifique, la cellule est considérée comme morte dans le cas où l'on observe une perte d'intégrité de la membrane plasmique (habituellement observée *in vitro*), une fragmentation de son noyau, la présence de fragments cellulaires étant phagocytés par les cellules voisines (ce phénomène est habituellement observé *in vivo*)¹²⁰.

L'étude des mécanismes de MCP est en constante évolution, tout comme les termes utilisés dans ces études. Le Comité de Nomenclature de Mort Cellulaire (NCCD « Nomenclature Committee on Cell Death ») a établi que le terme « programmé » dans MCP est attribué aux cas physiologiques de mort cellulaire, ceci indépendamment des modalités et caractéristiques de son exécution¹²¹. Ce terme réfère à une organogenèse et une différenciation contrôlées au cours du développement, ou encore aux événements morphologiques et biochimiques nécessaires à la maintenance de l'homéostasie à l'âge adulte. On utilise encore le terme « programmé » dans le cas de mort cellulaire où l'initiation et l'exécution sont finement régulées par la machinerie moléculaire, pouvant être inhibées de façon pharmacologique et/ou via l'utilisation d'approches génétiques¹²¹. Ces cellules mourantes peuvent alors exécuter leur processus de mort cellulaire par le biais de plusieurs voies de signalisation biochimiques distinctes.

III. Classification

Dans le cadre de la mort cellulaire, comme dans d'autres processus cellulaires, il est nécessaire de définir des catégories pour distinguer de façon précise le mécanisme cellulaire étudié. L'apoptose est le terme le plus utilisé pour définir le processus de mort physiologique. Il est cependant important de préciser qu'il existe également d'autres types de mort, se distinguant de part la morphologie adoptée par la cellule, ainsi que le mécanisme enzymatique impliqué et/ou les caractéristiques phénotypiques de la cellule mourante.

Au cours de la caractérisation génétique et biochimique de l'apoptose, des chercheurs ont étudié l'effet de l'inhibition ou de l'invalidation d'acteurs clés de ce processus. Ils ont mis en évidence différentes voies de signalisation pouvant être utilisées en plus de l'apoptose, en substitution ou en parallèle de celle-ci. La mort cellulaire a été décrite initialement comme un mécanisme entraînant une dégradation du génome (phénotype nucléaire), une disparition du cytosquelette, une activation de protéases, des altérations des organelles intracellulaires, ainsi que d'autres caractéristiques phénotypiques. Il reste cependant beaucoup à apprendre concernant l'interconnexion des acteurs régulant la mort cellulaire, ainsi que de ses modalités.

À ce jour, de nombreux travaux présentent les conditions cellulaires nécessaires à l'entrée de la cellule dans un mécanisme de mort, en fonction du type cellulaire étudié, ainsi que le stimulus utilisé. Ces différents types de MCP ont pu être observés par des études *in vitro* et *in vivo*¹²¹. Les caspases jouant un rôle clé dans l'apoptose dite classique, la mort cellulaire programmée est grossièrement classée biochimiquement, de façon caspase-dépendante ou caspase-indépendante. Dans le cadre de ma thèse, je me suis basé sur cette classification binaire. Le **tableau 6** présente les principaux types de mort cellulaire ainsi que leurs modalités, qui ont été proposés par le NCCD, classant la mort cellulaire en fonction de l'activation ou non des caspases^{120,121}.

Modalités des différents types de Mort Cellulaire Programmée (MCP)			
Mode de Mort Cellulaire	Sous-types/Initiateurs		Caractéristiques
Caspase-dépendante	Apoptose extrinsèque	Récepteurs de mort (TNFR, FASR, ...)	L'initiation se produit au niveau d'un récepteur de la membrane plasmique qui va transduire le message de mort et conduire à l'apoptose après activation des caspases
	Apoptose intrinsèque	Médié par : - dommage à l'ADN - stress oxydatif - autre stress intracellulaire ...	Conduit à la perméabilisation irréversible de la membrane mitochondriale (avec perte du potentiel $\Delta\psi$ M) et est déclenchée par l'activation des caspases
	MCP caspase-dépendante atypique	Anoikis Dépendant de la perte de signal avec la matrice extracellulaire	Retrouvée uniquement dans les cellules adhérentes. La voie apoptotique intrinsèque est utilisée. Ce type de mort est observé en absence de liaison de l'intégrine b1 et de facteurs de croissance (EGFR par exemple)
		Cornification	Retrouvée au niveau de l'épiderme, implique l'action des transglutaminases
		Pyroptose Récepteur cytosolique de l'ADN AIM2 (<i>Absent In Melanoma 2</i>)	Dépendante de l'activation de la caspase-1. Présente des caractéristiques morphologiques de cellules apoptotiques et/ou nécrotiques
Caspase-indépendante	Autophagie	Formation de vacuole avec le contenu du cytoplasme pour fusion avec les lysosomes pour former les phagolysosomes	
	Nécrose programmée	Nécroptose	Dépendante de RIP1/RIP3
		Parthanatos	Dépendante de PARP-1
		Mort cellulaire lysosomale	Perméabilisation de la membrane des lysosomes
		Autres	Gonflement des organites, rupture de la membrane plasmique avec ou non altération du noyau
	Catastrophe mitotique	Activation de la caspase-2, p53 et p73	Arrêt du fuseau mitotique dû à des aberrations chromosomiques graves durant la mitose. Observation de caractéristiques de cellules apoptotiques mais aussi nécrotiques
	MCP caspase-indépendante atypique	Entosis ou canibalisme cellulaire provoqué par la perte d'interaction avec la matrice extra-cellulaire	Dégradation de la cellule par les lysosomes
		Nétose	Formation de vacuole cytoplasmique, décondensation de la chromatine, explosion du noyau et des membranes granulaires

Tableau 6 : Modalités des principaux types de Mort Cellulaire Programmée (MCP)

Dans le cadre de mes travaux, je me suis plus particulièrement focalisé sur l'étude de l'apoptose, ce chapitre sera donc consacré à ce type de mort. L'apoptose est le type de MCP le plus largement connu et décrit. Il est d'ailleurs considéré comme la MCP dite « classique ». Elle se caractérise par l'absence ou la présence de faibles modifications des organelles cytoplasmiques, l'altération de la mitochondrie, la condensation de la cellule et de son noyau, la fragmentation de l'ADN, la rétractation des pseudopodes, l'externalisation des phosphatidylserines (jouant un rôle crucial dans la reconnaissance et l'élimination de la cellule apoptotique par l'organisme) et la déformation de la membrane (avec son maintien jusqu'aux stades finaux), la formation de corps apoptotiques contenant

les organelles intracellulaires^{120,122}. *In vivo*, on observe également une élimination physiologique des cellules apoptotiques par un mécanisme de phagocytose par les cellules voisines ou par des cellules spécialisées^{120,122}.

C'est dans les années 90 que les caspases ont été identifiées comme les acteurs effecteurs de l'apoptose, et que les connaissances sur la MCP ont fait de grandes avancées¹²³. Les caspases sont une famille de cystéine protéases ciblant spécifiquement les résidus acides aspartiques. À ce jour, 20 caspases différentes ont été identifiées chez l'Homme, avec 8 d'entre elles jouant un rôle crucial dans l'apoptose¹²⁴. La forme activée des caspases consiste en un complexe catalytique tétramérique formé de deux hétérodimères (deux larges, et deux petites sous-unités). Chacune d'entre elles provient d'un seul précurseur de caspase (nommée la procaspase) après un clivage protéolytique^{123,124}. Les caspases ont été réparties en deux catégories : les initiatrices et les effectrices. Le groupe des caspases initiatrices, composées des caspases -2 ; -4 ; -8 ; -9 et -10, clivent les procaspases effectrices, les activant de ce fait. Quant au groupe des caspases effectrices, comprenant les caspases -3 ; -6 et -7, elles ont pour action d'activer plus de caspases initiatrices et effectrices, engendrant une cascade d'activation des caspases clivant plus de substrats protéiques dans la cellule, pour permettre le processus apoptotique¹²³⁻¹²⁵. La cascade d'activation des caspases est bien connue pour être le « point de non-retour » dans l'engagement de la mort cellulaire^{120,121}.

On peut classer l'apoptose en deux groupes, selon la voie de signalisation utilisée pour activer les caspases : la voie extrinsèque ou intrinsèque (**figure 8**)^{120,125}. La classification de ces deux groupes dépend de l'origine du stimulus impliqué dans l'activation des caspases conduisant à la mort cellulaire.

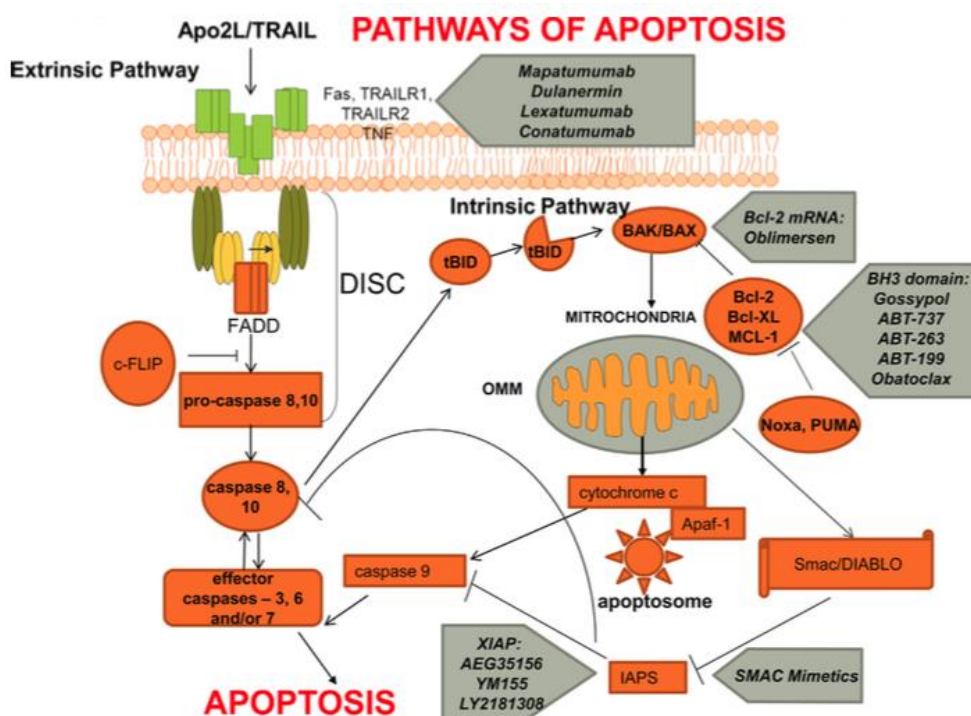


Figure 8 : Voie de signalisation de l'apoptose¹²⁶

Il existe différents niveaux de régulation de l'apoptose, que ce soit pour l'apoptose intrinsèque ou extrinsèque. L'initiation de la cascade d'activation conduisant à l'apoptose est extrêmement contrôlée du fait de la présence de très nombreux régulateurs. On retrouve les IAPs (« Inhibitor of Apoptosis Proteins »), famille inhibant l'activation des caspases initiatrices et effectrices, qui sont elles-mêmes inhibées par les protéines Smac/Diablo. Les protéines Smac/Diablo pourront avoir leurs activités inhibitrices sur les IAPs dans le cas où elles sont relarguées de la mitochondrie dans le cytoplasme.

La mort cellulaire est également très régulée par les membres de la famille des Bcl-2¹²⁷. Cette famille comprend des protéines pro-apoptotiques (comme Bax, Bax, Bok), mais aussi les « BH3-only » (Bim, Bid, Bik, Bad, Mbf, Hrk, Puma et Noxa). On retrouve également dans cette famille des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 et A1, qui ont pour rôle d'inhiber l'action des membres pro-apoptotiques. Je reviendrai sur les membres de cette famille dans la partie suivante. La famille des Bcl-2 joue en effet un rôle très important dans la modulation de la MCP dans diverses pathologies, tout particulièrement dans les cancers, où l'on retrouve une surexpression des membres anti-apoptotiques, et inversement, une inhibition de l'expression des protéines pro-apoptotiques. Ce phénotype transcriptionnel est entre autres à l'origine de la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose, malgré les dommages génétiques pouvant être observés. Nous avons par exemple parlé de

la surexpression de *BCL-2* observée dans la LLC, ainsi que l'expression de *MCL-1* qui dans la LLC également est corrélée à des facteurs de mauvais pronostic^{128,129}.

IV. Les acteurs majeurs de l'apoptose

Le devenir d'une cellule est lié à la balance entre les effecteurs de la survie et de la prolifération cellulaire, et ceux permettant l'entrée de la cellule dans des mécanismes de MCP. Il est donc impossible de dissocier les protéines liées à la survie cellulaire, de celles liées à la mort¹³⁰. Je vais maintenant vous présenter les principaux acteurs de l'apoptose.

La protéine p53

TP53 est un gène suppresseur de tumeur qui est souvent muté dans les cancers¹³¹, et qui est retrouvé délété et/ou muté dans la LLC en particulier^{55,56}. L'activité de p53 dépend de sa localisation cellulaire. En effet, cette protéine a la capacité de se lier à l'ADN et grâce à son domaine de transactivation, elle va ainsi pouvoir induire ou réprimer l'expression d'un large nombre de gènes conduisant soit à l'arrêt du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose, ou la sénescence¹³². p53 joue également un rôle au niveau de la mitochondrie. Elle peut en effet induire le relargage du cytochrome c entre autre, par la formation d'un complexe avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-Xl et Bcl-2¹³³. A l'état physiologique et en cas de dommage à l'ADN ou de stress cellulaire, la protéine ATM (dont le gène est également muté ou délété dans la LLC) va être activée par phosphorylation et elle va elle-même phosphoryler p53 à son tour pour l'activer. p53 va alors induire l'arrêt du cycle cellulaire par l'expression de p21. Dans le cas où les dommages à l'ADN sont trop importants, p53 peut également induire l'apoptose de la cellule par différents moyens comme la surexpression de la protéine Bax, protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 ; réprimer l'expression des protéines Bcl-2 et de la survivine (membre des IAPs et qui est un inhibiteur de l'apoptose comme Bcl-2).

Signalisation par la membrane plasmique

D'un point de vue physiologique, la membrane plasmique est considérée comme une barrière physique entre le contenu cellulaire et le milieu/matrice extracellulaire. Cette membrane joue alors un rôle dans la régulation de l'entrée et la sortie d'éléments, mais également la transmission de message via la stimulation d'un récepteur par exemple. Mais dans le cadre de la mort cellulaire, cette membrane va jouer un rôle crucial. On la retrouve en effet dès l'étape d'initiation, au cours de laquelle une molécule va se fixer sur un récepteur pour transduire un signal induisant la mort de la cellule¹²¹. Parmi ces

molécules, on retrouve le ligand FASL et le TNF. Enfin, dans l'étape finale, la membrane plasmique va conduire à l'élimination de la cellule, *via* principalement l'externalisation de phosphatidylserine et de calréticuline, qui correspondent à un signal « mange-moi » de la cellule. En effet, l'externalisation de ces deux protéines va permettre la reconnaissance de celles-ci par les phagocytes et entraîner une phagocytose (destruction et élimination de la cellule morte). Il est d'ailleurs important de noter que dans le cadre de l'étude de la mort cellulaire *in vitro*, la perméabilisation de la membrane plasmique est l'un des principaux marqueurs indiquant que la cellule se trouve à une étape finale de MCP.

Les protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de cette famille (**figure 9**), sont divisées en trois groupes selon leurs rôles : les anti-apoptotiques, les pro-apoptotiques et les « BH3-only » (qui sont également pro-apoptotiques)¹²⁴. Les protéines anti-apoptotiques vont s'opposer aux pro-apoptotiques et aux « BH3-only », cette opposition est très souvent comparée à une balance entre des protéines pro-survie ou pro-mort. Elles jouent un rôle majeur, principalement au niveau de la mitochondrie^{124,134,135}. Dans des conditions normales, les protéines Bax et Bak sont sous forme inactive, avec Bax qui est séquestrée dans le cytosol par différentes protéines dont Bcl-2¹³⁵. Mais lorsqu'un stimulus d'apoptose survient, Bax change de conformation et va être relocalisée au niveau de la membrane mitochondriale. Elle va alors s'homo- ou s'hétérodimériser avec Bax ou Bak respectivement pour former un pore mitochondrial et libérer les effecteurs de la mort contenus dans la mitochondrie. Ce modèle d'induction de l'apoptose au niveau mitochondrial est défini comme le modèle indirect. Le modèle direct fait intervenir des protéines « BH3-only » (comme Bid et Bim) qui vont directement interagir avec Bax et Bak pour faciliter le changement de conformation et former les pores mitochondriaux^{124,135}.

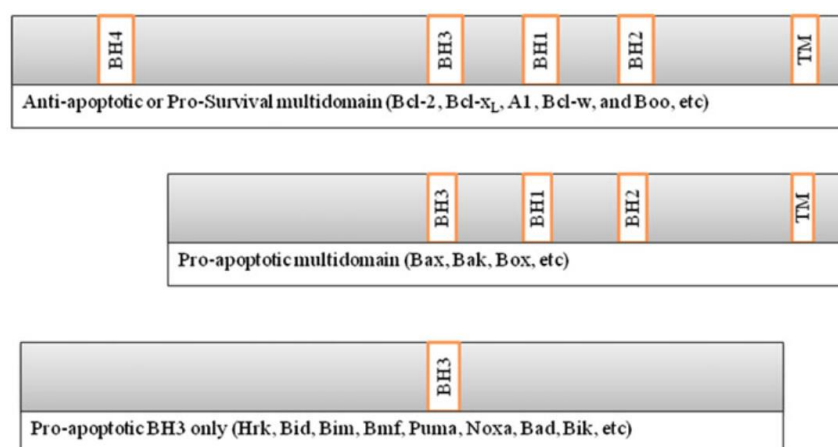


Figure 9 : Les protéines de la famille Bcl-2¹²⁴. TM : « transmembrane domaine » (domaine transmembranaire)

Il existe également un lien entre la protéine p53 et le gène *Bax*. L'accumulation de dommages à l'ADN va provoquer la relocalisation de p53 dans le noyau qui était alors séquestrée dans le cytoplasme pour y être dégradée, conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire. Mais p53, via son domaine de transactivation, va donner lieu à la surexpression de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme *BAX* ou encore *NOXA*, entraînant une balance Bcl-2/Bax qui penchera vers Bax par exemple, engendrant par la suite une dépolarisation de la mitochondrie ainsi que la libération des effecteurs de mort présents dans la mitochondrie^{119,136}.

La Mitochondrie

Cette organite cellulaire a comme fonction première de réaliser la respiration mitochondriale, conduisant à la détoxification de la cellule et à une génération d'énergie sous forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate). Mais la mitochondrie joue également un rôle majeur dans l'exécution de la MCP. Elle est ainsi capable de recevoir et de générer des signaux de mort à son tour.

La mitochondrie est composée d'une membrane externe et d'une membrane interne, avec entre les deux l'espace inter-membranaire (**figure 10**). Dans le cas où la cellule a reçu un stimulus de mort, comme l'activation par homo- ou hétéro-dimérisation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bax/Bak au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, on observe une perte du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\psi_m$), ce qui va conduire à deux effets :

- (1) : arrêt de la fonction respiratoire et de la synthèse d'ATP de la mitochondrie dûe à un découplage des coenzymes de la chaîne respiratoire. Ceci conduit à une oxydation du cytoplasme et à l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ainsi qu'à une perte d'énergie par la cellule ce qui entraîne la genèse de nouveaux signaux de mort pour la cellule. Les ROS vont en effet avoir un effet toxique sur l'ADN en entraînant des dommages, mais aussi en formant des lipides peroxydés qui vont induire la MCP.
- (2) : la formation de pores au niveau de la mitochondrie va engendrer le relargage dans le cytoplasme de protéines pro-apoptotiques. Parmi ces protéines, on retrouve le cytochrome c, qui active l'apoptosome, constitué également de la caspase-9 et de Apaf-1, et qui déclenche la voie d'apoptose classique. Ainsi que les protéines EndoG et AIF qui ont pour action de dégrader l'ADN, ainsi que Omi/HtrA2 qui dégrade le cytosquelette, Smac/Diablo qui inhibe l'activité des protéines de la famille des IAPs et donc conduire à augmenter l'activité des protéines apoptotiques.

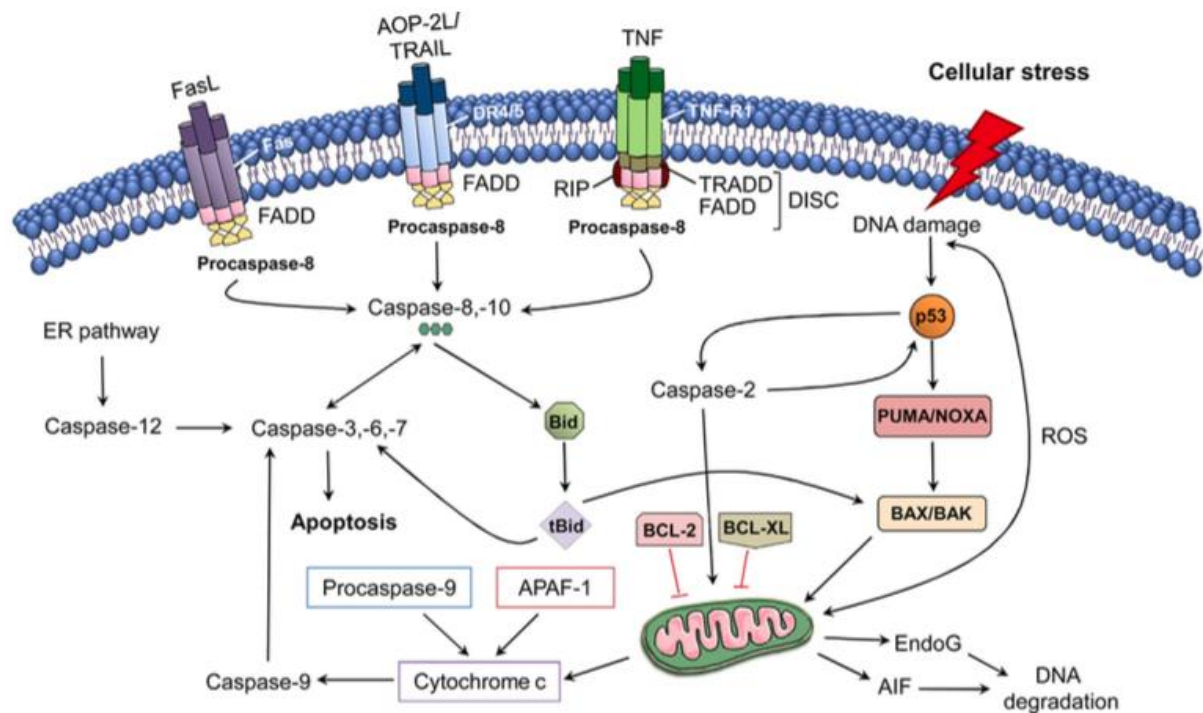


Figure 10 : La mitochondrie, les caspases, la famille Bcl-2 et l'apoptose¹³⁷

Les protéines relarguées et la perte d'activité de la mitochondrie vont conduire à une amplification des signaux de mort cellulaire. Comme on peut le voir, les protéines relarguées par la mitochondrie ont chacune une activité bien distincte, ce qui va précipiter la mort de la cellule du fait de la dégradation simultanée de l'ADN et des protéines cellulaires. La perte du potentiel membranaire mitochondrial est d'ailleurs utilisée *in vitro* comme indicateur de viabilité.

Les protéases

Les protéases clés dans l'apoptose sont les caspases que je vous ai présentées précédemment. Ce sont des cystéines-protéases divisées en deux groupes, les initiatrices et les effectrices. A noter qu'il existe d'autres classes de protéases qui jouent également un rôle dans la MCP comme les serpins, les granzymes ou la protéine HtrA2¹³⁸. Dans la famille des cystéines-protéases sont également présentes les calpaïnes qui sont des protéases dépendantes du calcium, et les cathepsines retrouvées de façon prédominante dans les lysosomes et dont l'activité dépend du pH.

V. Implications physiopathologiques de l'apoptose dans la LLC

Nous avons parlé avant du rôle physiologique de l'apoptose, et le rôle clé qu'elle joue dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Cependant, la dérégulation de l'apoptose est liée au développement de pathologies tel que les cancers¹³⁹. Un défaut d'apoptose peut être relié à des maladies comme les cancers, j'ai déjà cité l'exemple de la LLC, mais on retrouve également un défaut d'apoptose dans la Leucémie Myéloïde Chronique associé au transcrit de fusion BCR-ABL1¹⁴⁰, ou dans des maladies auto-immunes comme le lupus¹⁴¹. Dans le cas inverse, un excès d'apoptose peut être responsable du développement de troubles neurodégénératifs comme les maladies d'Alzheimer et Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique¹³⁷.

Dans le cadre des cancers, l'accumulation de cellules tumorales peut être due d'une part à l'augmentation de la prolifération, et d'autre part à l'inhibition de l'apoptose. Bien évidemment, l'un n'exclut pas l'autre, et il est souvent observé une coopération des deux.

Concernant la LLC, le pool prolifératif des cellules de LLC est localisé au niveau de la moelle osseuse et des ganglions grâce aux interactions entre les cellules de LLC et les cellules stromales, les nurse-like et les lymphocytes T. Ces cellules du microenvironnement produisent des chimiokines/cytokines qui activent des voies de signalisations comme NF- κ B ou PI3K/AKT. Les cellules leucémiques présentes dans le sang sont à l'état quiescent contrairement aux cellules présentes dans le microenvironnement qui sont prolifératives¹⁴². Les cellules de LLC ont déjà ces voies actives de façon constitutionnelle, permettant ainsi la surexpression de protéines ayant une activité anti-apoptotique comme plusieurs membres de la famille Bcl-2 (comme *BCL-2* et *MCL-1*) ou de la famille des IAPs (avec *XIAP*, *cIAP1* et *cIAP2*)¹⁴³.

L'inactivation de *TP53* par délétion/mutation, bien que présente dans un faible pourcentage de LLC, est également un événement qui confère une résistance à l'apoptose des cellules leucémiques. En effet, l'absence d'activité de cette protéine va indirectement induire une surexpression de *BCL-2* ou de la survivine, conférant une augmentation du nombre de signaux de survie de la cellule. Et faisant ainsi pencher la balance vie/mort du côté de la vie. Il a également été décrit dans la LLC la balance entre le niveau des protéines Noxa (« BH3-only ») et Mcl-1 (anti-apoptotique). L'inhibition du protéasome par une drogue, le bortezomib, induit une augmentation du niveau de protéine Noxa conduisant à une augmentation de l'apoptose des cellules de LLC¹⁴⁴. La protéine de survie Bcl-2 est très largement retrouvée surexprimée dans les cancers et associée à une résistance à l'apoptose (LLC, lymphomes et neuroblastomes par exemple)¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

La surexpression de protéines jouant un rôle anti-apoptotique, la diminution de l'activité de protéines suppresseur de tumeurs, ou encore les signaux de survie fournis par le microenvironnement

sont autant de facteurs qui vont permettre à la cellule tumorale d'échapper à la mort cellulaire. On retrouve en parallèle à ces événements les mutations de gènes clés impliqués dans des voies de survie, comme *NFKBIE* pour la voie NF- κ B, les mutations de *NOTCH1* ou encore de *BIRC3* qui sont également retrouvées dans la LLC, et vont favoriser la survie des cellules leucémiques.

VI. Induction de la mort cellulaire par le traitement de la LLC

Pour induire la mort des cellules de LLC, et des cellules cancéreuses en général, il est nécessaire d'identifier une ou plusieurs cibles. Ces cibles se caractérisent par le fait qu'elles jouent un rôle dans la survie ou la mort, de par leurs fonctions dans une voie de signalisation, et/ou leur expression qui est altérée par rapport aux cellules saines. Il est en effet important que le traitement affecte un minimum les cellules saines, pour diminuer ainsi au maximum le risque d'effets secondaires. Dans les cancers et la LLC, on observe en effet un défaut de fonction/expression des acteurs de la mort (pro-mort) et une surexpression/activation des acteurs de la survie, on peut symboliser ceci par une balance (figure 11).

L'une des principales méthodes utilisées consiste à augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses à la mort cellulaire, par la stimulation de l'apoptose, avec par exemple des agents alkylants ou des analogues de purine (cyclophosphamide et fludarabine pour la LLC respectivement).

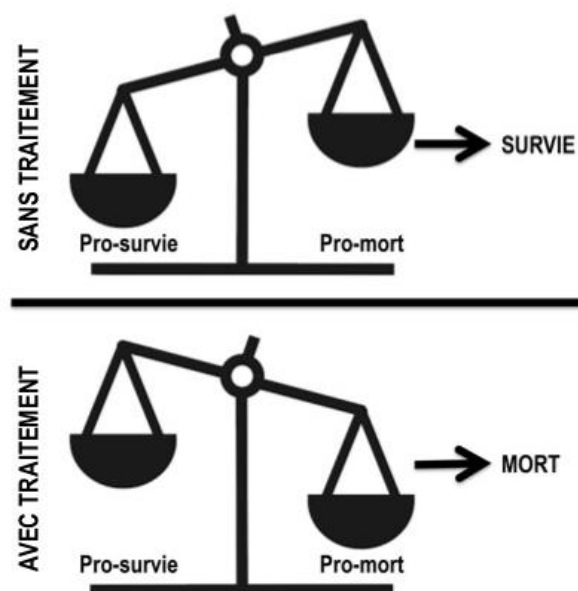


Figure 11 : La balance entre la vie et la mort d'une cellule cancéreuse en fonction des signaux qu'elle reçoit

D'autres méthodes peuvent également être utilisées : il est possible par exemple d'inhiber les protéines de la famille des IAPs par l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens, ou d'utiliser des antagonistes des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2¹⁴⁸. On fait ainsi pencher la balance mort/vie du côté de la mort. Des essais sont d'ailleurs actuellement en cours pour valider ces deux stratégies. Les agents les plus connus sont les drogues appelées « BH3-mimetics », et vont avoir pour action de se fixer sur le domaine BH3 pour altérer son action inhibitrice^{148,149}. On peut citer les exemples des ABT-737, ABT-199 dont j'ai parlé plus haut dans la partie Traitement de la LLC. Cependant, la principale faiblesse de ce type de stratégie provient du fait que toutes les protéines anti-apoptotiques ne sont pas ciblées. De ce fait, les cellules tumorales peuvent échapper à la mort par la surexpression d'autres membres anti-apoptotiques ou simplement du fait qu'elles n'utilisent pas principalement la protéine cible pour fournir des signaux de survie.

Mais il n'y a pas que les BH3-mimetics ou inhibiteurs d'IAPs. Le traitement par la tri-thérapie RFC est actuellement le traitement de première ligne dans la LLC. Comme on a pu le voir plus haut, ce traitement induit une mort cellulaire dépendante de p53 par l'action de 3 molécules visant à inhiber le cycle cellulaire, induire des dommages à l'ADN et une réponse de l'organisme dépendante de l'ADCC. D'autres recherches ont cherché à rétablir l'activité de la protéine p53, chez les patients ne présentant pas d'altération génétique pour le gène *TP53*. Il est ainsi testé des drogues pour inhiber l'interaction MDM2-p53 pour rétablir la translocation de p53 dans le noyau avec son activité de tumeur suppresseur, ou encore l'infection chez les patients p53 déficient d'un adénovirus codant la protéine p53. Un essai clinique a d'ailleurs montré que la thérapie génique avec p53 permettait d'augmenter le pourcentage de survie par rapport à la chimiothérapie classique chez des patients atteints de carcinomes¹⁵⁰.

Chapitre III. L'export nucléocytoplasmique

I. Généralités

Chez les cellules eucaryotes, les différents processus de synthèse d'ADN, transcription d'ARN, synthèse et maturation de protéines ont lieu dans des compartiments intracellulaires distincts. L'export nucléocytoplasmique est le mécanisme permettant le transport d'ARNm ou de protéines du noyau vers le cytoplasme et l'import nucléaire permet par exemple l'entrée dans le noyau des protéines nécessaires à la transcription ou à la régulation du cycle cellulaire. Ce processus joue un rôle majeur dans l'homéostasie cellulaire, en particulier dans la régulation de la mitose cellulaire par l'entrée ou la sortie de la cycline B1¹⁵¹. D'autres processus cellulaires comme l'apoptose vont être régulés également par l'import des caspases dans le noyau, ou par l'export de p53 afin d'éviter une entrée en apoptose comme on peut le voir dans le cas des cancers^{152,153}.

Ce transport peut être réalisé de façon passive ou active. On parlera de transport passif lorsque le poids moléculaire de la molécule est inférieur à 40 kDa. Ce transport ne fait pas appel à des protéines pour faciliter le transport et ne consomme pas d'énergie. Les molécules vont simplement diffuser d'un compartiment à un autre en passant à travers la membrane nucléaire ou le NPC (« Nuclear Pore Complex »). Le NPC est un complexe protéique composé d'environ 30 protéines appelées nucléoporines (« NUP »), avec un poids moléculaire approximatif du NPC de 125 MDa. Le NPC traverse la double couche de phospholipides constituant la membrane nucléaire en formant un pore ouvert (**cf figure 12**). Dans le cas du transport actif, nécessitant une consommation d'énergie, des protéines vont être nécessaires pour permettre le passage d'un compartiment à l'autre. Ces protéines sont membres de la superfamille des β -importines, également appelée Karyophérines.

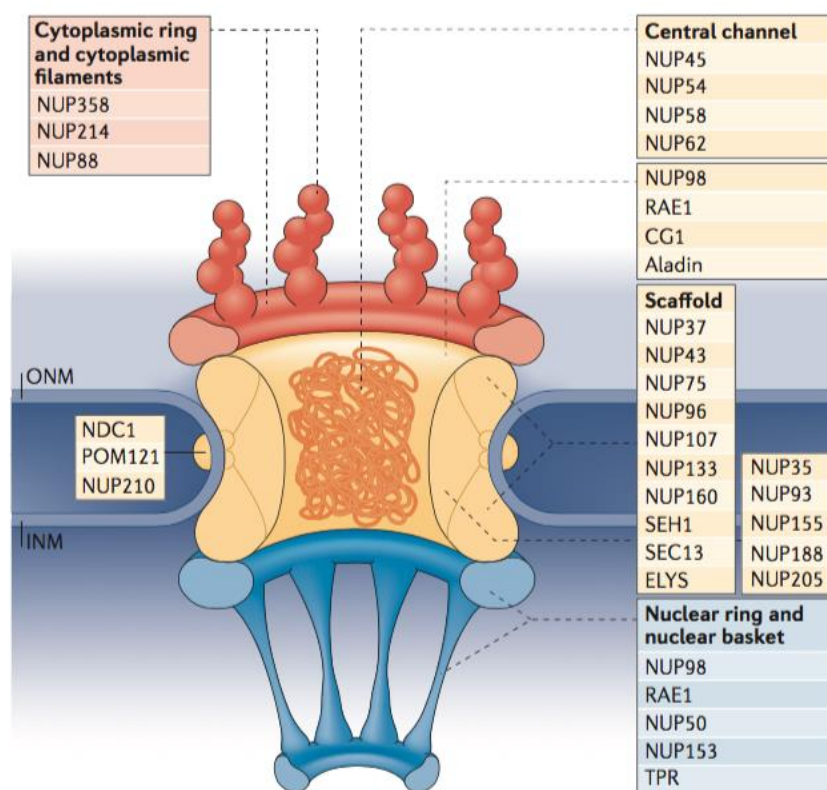


Figure 12 : Structure schématisé du NPC¹⁵⁴. ONM : « Outer Nuclear Membrane » (membrane nucléaire externe) ; INM : « Inner Nuclear Membrane » (membrane nucléaire interne)

II. La superfamille des Karyophérines

1. Les importines, les exportines, les transportines

Il existe trois groupes différents dans la famille des Karyophérines, les importines, les exportines et les transportines. Elles ont la capacité de transporter les protéines cibles appelées cargos, du cytoplasme au noyau, du noyau au cytoplasme, ou dans les deux sens respectivement. A ce jour, 19 membres sont recensés dans la famille des Karyophérines¹⁵⁵ : 8 importines, 7 exportines, et 4 transportines¹⁵⁵. Ces protéines ont la capacité de reconnaître des séquences NLS/NES (« Nuclear Localization Signal/Nuclear Export Signal ») indiquant leur localisation cellulaire. De façon intéressante, chaque importine ou exportine reconnaît une séquence spécifique et donc des cibles différentes^{155–157}. De plus, il existe plusieurs types de séquences NLS¹⁵⁸ et NES¹⁵⁹, et certaines protéines cibles peuvent présenter les deux types de signaux de localisation (comme les protéines STAT, NFAT ou encore SIRT1)¹⁶⁰.

Les membres de cette famille ont un poids moléculaire allant de 95 à 145 kDa et l'on ne retrouve que peu d'homologie dans leur séquence (inférieure à 20%)^{161,162}. Les protéines de cette famille partagent cependant des similarités au niveau N-terminal correspondant au domaine de liaison avec la protéine RanGTP¹⁶², nécessaire à leur activité. Elles ont une architecture tridimensionnelle en super-hélice composée d'une répétition de domaines HEAT qui sont constitués d'un motif d'environ 40 acides aminés¹⁶³.

A l'heure actuelle, les voies d'import et d'export nucléaire les mieux caractérisées sont celles impliquant la voie de l'importine β et de XPO1 respectivement, du fait du grand nombre de cargos dont elles régulent le transport^{164,165}. Alors que la voie de l'importine β est capable de reconnaître des NLS classiques mais également des NLS atypiques grâce à l'aide d'adaptateurs, XPO1 ne reconnaît qu'un seul type de NES, les LR-NES pour « Leucine-Rich Nuclear Export Signal »¹⁶⁶. Il existe deux bases de données informatiques accessibles depuis internet^{167,168} permettant de voir la liste des cibles de XPO1 ainsi que de prédire d'après une séquence protéique si une LR-NES est présente^{167,168}. Il existe également une base de données pour les protéines étant importées dans le noyau¹⁶⁹. A ce jour plus de 220 cargos ont été validés comme étant des cibles de XPO1. XPO1 est la seule des exportines qui a pour cible des protéines suppresseur de tumeurs (TSP) comme p53, Rb, BRCA1/2, APC, p21, p27. Parmi les cibles de XPO1, on va également retrouver des protéines jouant un rôle dans la régulation de l'apoptose (FOXO3, ABL1, Bok, BIRC5, la survivine) mais aussi des régulateurs de la transcription ou des protéines jouant un rôle dans plusieurs voies de signalisation importantes (RELA, STAT1, IRF3, SMAD4, e2f4, HDAC4/5, NFAT5, tax, NFKBIA, NFKBIE).

2. Mécanisme d'export nucléaire : exemple de XPO1

Le mécanisme d'export nucléocytoplasmique régulé par XPO1 peut être décomposé en quatre étapes^{92,159} : (**cf figure 13**)

1. Dans le noyau, XPO1 se lie de façon coopérative avec son cargo qui présente une séquence LR-NES et la protéine RanGTP pour former le complexe XPO1_Cargo_RanGTP (complexe d'export). La protéine RanBP3 participe à cette interaction en facilitant la formation du complexe.
2. Le complexe d'export se lie à plusieurs nucléoporines au niveau du NPC dont Nup98 qui est localisée du côté nucléaire. Ce complexe d'export passe ensuite à travers le NPC et se lie avec d'autres nucléoporines cette fois-ci du côté cytoplasmique du NPC. Parmi les nucléoporines du côté cytoplasmique se liant à XPO1, on trouve les Nup214 et Nup88.

3. Dans le cytoplasme, le complexe d'export interagit avec les protéines RanBP1 et RanBP2 (=Nup358) qui vont faciliter l'interaction entre RanGTP et RanGAP1. La protéine RanGAP1 va alors catalyser la réaction d'hydrolyse de RanGTP en RanGDP.

4. Une fois la transformation RanGDP terminée, le complexe d'export est dissocié, le processus d'export est terminé et XPO1 est recyclé dans le noyau pour poursuivre son activité.

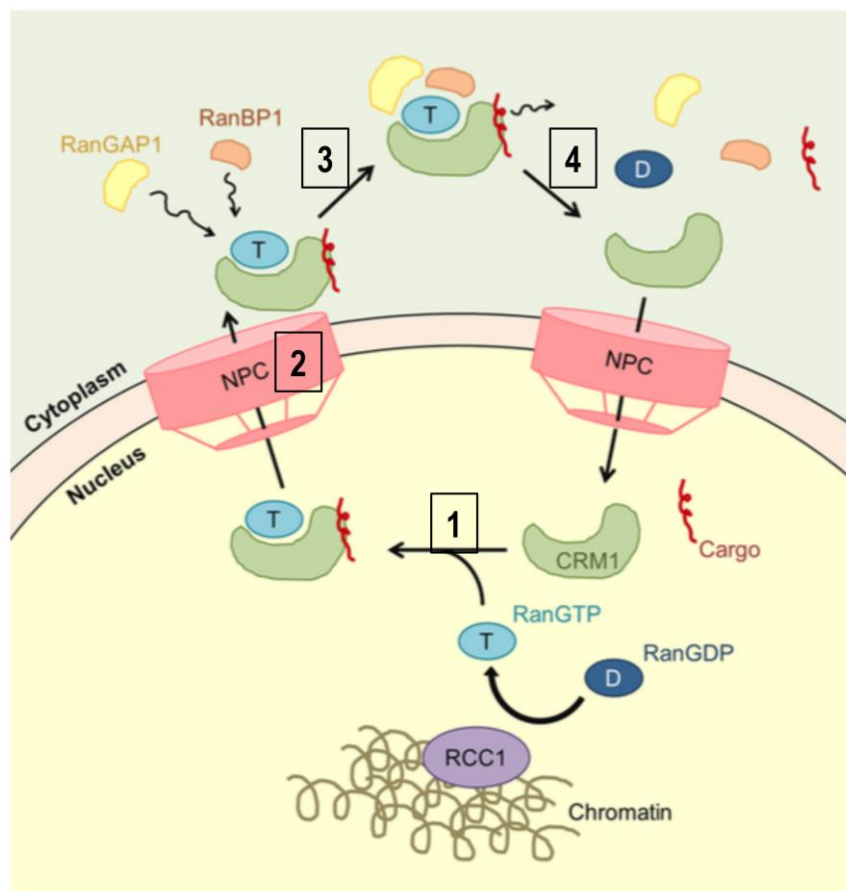


Figure 13 : Mécanisme d'export nucléocytoplasmique régulé par CRM1/XPO1 (image dérivée de Fung et al., 2014 Seminars in Cancer Biology)

III. XPO1, rôle et cible thérapeutique dans les cancers

1. XPO1 et Cancer

La localisation cellulaire des protéines est essentielle pour leurs activités, et le bon fonctionnement de la cellule. Dans le cas des cancers, on observe une mauvaise localisation cellulaire de certaines protéines régulant le cycle cellulaire ou l'apoptose comme p27 ou p53. Comme dit

précédemment dans le Chapitre portant sur la Mort Cellulaire, l'activité de p53 dépend de sa localisation cellulaire. Si p53 n'est pas présente dans le noyau, elle ne pourra pas inhiber le cycle cellulaire et induire l'apoptose des cellules tumorales, et elle sera dégradée par le protéasome après ubiquitination par MDM2.

XPO1 joue un rôle important dans les cancers, où l'export nucléaire est augmenté. C'est en particulier l'activité de *XPO1* qui est augmentée car il est nécessaire que cette protéine relocalise dans le cytoplasme les TSP qui auraient une activité péjorative pour la cellule cancéreuse.

XPO1 a été trouvé surexprimé par rapport aux cellules saines dans une large variété de tumeurs solides (cancer des ovaires, ostéosarcome, mélanome, gliome), et sa surexpression a été associée à un mauvais pronostic ainsi qu'à une survie plus courte¹⁷⁰⁻¹⁷³. *XPO1* est également surexprimé dans des hémopathies malignes comme la leucémie myéloïde chronique, le lymphome du manteau, la leucémie aigue, et le myélome multiple, où la surexpression de *XPO1* est également corrélée avec la progression de la maladie¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), la surexpression de *XPO1* est associée à une survie globale plus courte¹⁷⁷.

Une translocation chromosomique fusionnant les gènes *XPO1* et *MLLT10* a récemment été identifiée chez un patient atteint de leucémie aigue lymphoblastique T (T-ALL)¹⁷⁸. *MLLT10* est un gène codant un facteur de transcription régulant l'expression des gènes de la famille *HOXA*. Cette translocation, n'engendrant pas de décalage du cadre de lecture, pourrait avoir un rôle fonctionnel. Le profil d'expression des gènes de la famille *HOXA* chez le patient présentant la translocation *XPO1-MLLT10* était identique aux patients présentant une translocation *PICALM-MLLT10*, confirmant que la translocation *XPO1-MLLT10* n'altère pas l'activité de *MLLT10*. Cependant, un seul cas de translocation *XPO1-MLLT10* a été identifié chez une cohorte de 84 patients, suggérant que cette translocation est rare. De plus, les auteurs n'ont pas étudié le rôle de *XPO1* dans cette translocation.

Concernant la LLC, *XPO1* a été décrit comme surexprimé dans les cellules de LLC par rapport aux lymphocytes B de donneurs sains¹⁷⁹. De plus, comme déjà dit dans le chapitre I, *XPO1* est muté de façon récurrente dans la LLC. *XPO1* pourrait donc jouer un rôle dans la LLC de par sa surexpression ou sa mutation.

D'autres acteurs du transport nucléocytoplasmique peuvent être impliqués dans les cancers. Il a en effet été décrit dans plusieurs hémopathies malignes, et en particulier dans les LAM, des translocations entraînant la fusion de deux nucléoporines (NUP98 et NUP214) avec d'autres gènes comme *ABL1* et des gènes de la famille *HOXA*¹⁸⁰. Pour rappel, NUP98 et NUP214 sont les deux nucléoporines qui interagissent avec *XPO1* lors de l'export nucléocytoplasmique. Les fusions faisant intervenir ces deux nucléoporines vont conduire à un changement de la localisation cellulaire. Alors que NUP214 est cytoplasmique et NUP98 dans la partie nucléaire du NPC, elles vont être relocalisées au

niveau nucléaire ce qui va conduire à une inhibition de l'export nucléocytoplasmique médié par XPO1¹⁸⁰. Il va donc y avoir une accumulation des cargos de XPO1 dans le noyau. Une des hypothèses est que l'accumulation dans le noyau de XPO1 serait nécessaire pour stabiliser le centrosome par un moyen non encore élucidé mais qui est connu comme étant une des fonctions de XPO1. De plus, NUP98 et NUP214 possèdent des séquences répétées FG (riche en phénylalanine et glycine) qui peuvent agir comme des coactivateurs ou des corépresseurs transcriptionnels, et qui sont conservées dans les fusions. Le changement de localisation cellulaire et la capacité de transactiver des gènes suggèrent que les fusions avec NUP98 ou NUP214 conduisent également à une altération du profil transcriptionnel de la cellule. Enfin, un sous-ensemble de LAM présente des mutations du gène *NPM1* (« nucleophosmin »), qui entraîne la formation d'une NES reconnu par XPO1, et qui conduit à la localisation aberrante de NPM1 dans le cytoplasme^{181,182}.

2. XPO1, une cible thérapeutique

La leptomycine B (LMB) fut la première molécule identifiée comme inhibant spécifiquement XPO1. Cette drogue, provenant d'une bactérie (*Streptomyces*) se lie de façon spécifique et covalente à XPO1 au niveau du résidu C528. Cette liaison au niveau du site actif de XPO1 inhibe ainsi l'interaction avec les cargos de XPO1. Un essai clinique de Phase I avec l'elactocin a été initié après que cette molécule ait été décrite comme ayant une activité anti-tumorale sur plusieurs modèles de cancers incluant la leucémie et des tumeurs solides comme les carcinomes ou le cancer du colon¹⁸³. Les résultats de l'essai de Phase I réalisé sur une cohorte de patients atteint de cancers réfractaires (colon, ovaires, mélanome, sarcome) ont montré une forte toxicité, avec anorexie, malaises et vomissements, mais une bonne réponse au traitement. C'est pourquoi la recherche et le développement de nouvelles molécules inhibant spécifiquement XPO1 a continué. D'autres molécules ont ainsi pu être développées, comme les analogues du Ratjadone ou la molécule CBS9106¹⁸⁴. L'un des analogues, le Ratjadone C a d'ailleurs été testé *in vitro* sur des lignées cellulaires de myélome multiple où il sensibilisait les cellules à l'inhibition de la topoisomérase II, qui est également une cible de XPO1¹⁸⁵. La molécule CBS9106 a également été testée *in vitro* sur 60 lignées cellulaires de différents cancers (colon, poumons, prostate, pancréas, myélome multiple), où elle induisait l'apoptose des cellules avec une dégradation de XPO1. Un modèle de xénogreffe a aussi été réalisé et a montré une inhibition de la croissance tumorale ainsi qu'une augmentation de la survie sans perte de poids des souris¹⁸⁶.

D'autres inhibiteurs de XPO1 existent à l'heure actuelle, et une nouvelle classe d'inhibiteurs de XPO1 a été décrite récemment et montre de très bons résultats *in vitro*, mais également *in vivo* chez des xénogreffes ou encore au cours d'essai clinique. Cette nouvelle classe d'inhibiteurs appelés SINE

pour « Specific Inhibitors of Nuclear Export » est développée par une entreprise pharmaceutique américaine, Karyopharm Therapeutics©. Cette entreprise a développé plusieurs molécules nommées KPT- qui se lient de façon irréversible à XPO1 au niveau du résidu C528. Le KPT-330, ou Selinexor, est actuellement en essai clinique pour plusieurs cancers solides et hémopathies malignes (**cf figure 14**). Des essais *in vitro* et/ou *in vivo* des inhibiteurs de XPO1 fournis par Karyopharm avaient été réalisés au préalable dans divers cancers solides^{172,187–192} et hémopathies malignes^{174–176,193–195}.

Par exemple, Salas Fragomeni *et al.* ont mis en évidence que l'inhibition *in vitro* de XPO1 induisait une diminution de la prolifération cellulaire indépendamment de la présence ou de l'absence de la mutation de *BRAF* dans les lignées de mélanomes. De plus, un effet synergique avec induction d'apoptose était observé lors du co-traitement avec l'inhibiteur de XPO1 et un inhibiteur de *BRAF*, ce que les auteurs ont confirmé par une étude *in vivo* chez la souris après xénogreffe où une rémission complète a été observée¹⁸⁹.

Dans le myélome multiple, les travaux de Schmidt *et al.* ont montré que le traitement *in vitro* de cellules de patients par un inhibiteur de XPO1 (le KPT-276) induisait l'apoptose. Les auteurs ont également mis en évidence que les cellules tumorales CD138+ étaient sensibles à la mort induite par l'inhibition de XPO1 alors que la fraction non-tumorale CD138- n'était pas affectée par l'inhibition de XPO1¹⁷⁶.

La spécificité tumorale des inhibiteurs de XPO1 a également été évaluée dans le cadre de la LAM. Etchin *et al.* ont ainsi démontré que les cellules hématopoïétiques saines (plaquettes, globules blancs) n'étaient pas sensibles au traitement par un inhibiteur de XPO1 (KPT-251) contrairement aux cellules de lignées cellulaires de LAM dans un modèle de xénogreffe de souris ¹⁹⁶.

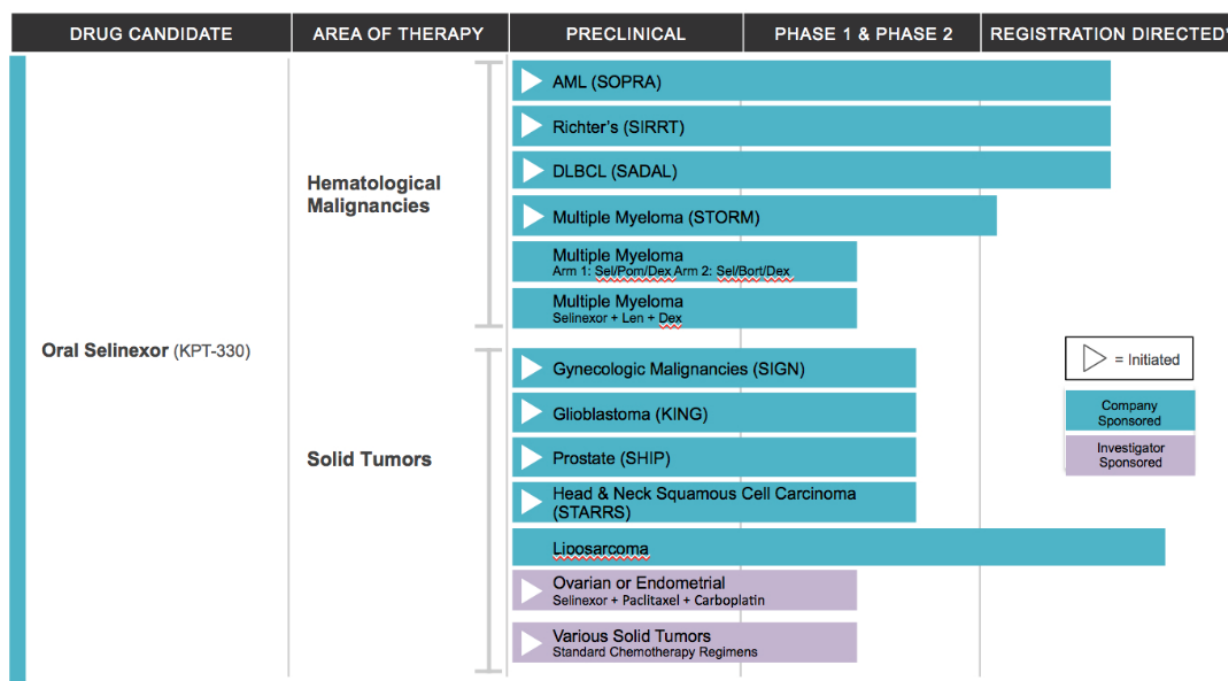


Figure 14 : Essais cliniques avec Selinexor (KPT-330) dans les cancers (<http://karyopharm.com/drug-candidate/products-pipeline/>)

Dans la LLC, une première étude a mis en évidence que le traitement par un inhibiteur de XPO1 (le KPT-185) induit l'apoptose spécifiquement dans les cellules de LLC, indépendamment de la présence de facteurs de bon ou de mauvais pronostic (del(13q), tri12, del(17p), del(11q), statut non-muté *IGHV*). A noter que cependant, la présence d'un statut muté *IGHV* réduit la sensibilité des cellules à la mort induite par l'inhibiteur de XPO1, même en présence de la del(17p)¹⁷⁹. Le traitement avec l'inhibiteur de XPO1 n'induit pas la mort des lymphocytes B de donneurs ni des lymphocytes T ou les cellules NK, cependant, il diminue la production d'interleukines 6 et 10 sécrétées par ces cellules. Les auteurs ont montré que cette apoptose est associée à une relocalisation dans le noyau de p53, mais également d'un inhibiteur de la voie NF- κ B, I κ B. Ils ont également pu observer que les signaux de survie que reçoivent les cellules de LLC dans le microenvironnement ne modulent pas la réponse après inhibition de XPO1 *in vitro*. L'étude dans un modèle de souris LLC a également permis de voir que le traitement par l'inhibiteur de XPO1 (le KPT-251) est plus efficace au niveau de la survie globale et de la survie sans progression que le traitement par la fludarabine¹⁷⁹.

Une seconde étude s'est intéressée à l'effet du Selinexor sur la signalisation du BCR, la prolifération et la migration des cellules de LLC¹⁹⁷. Dans un premier temps les auteurs ont confirmé les résultats obtenus dans l'étude de Lapalombella *et al.*, en montrant que le Selinexor induit la mort des cellules de LLC, même en présence de la del(17p). Ils retrouvent également une diminution de la

sensibilité à la mort après traitement par le Selinexor lorsque les cellules de patients LLC sont mutées pour les *IGHV*. Dans un second temps, les auteurs ont traité les cellules de LLC avec du CpG pour induire la prolifération, et après traitement par le Selinexor, ils ont pu voir une inhibition de la prolifération. Les auteurs ont également pu observer *in vitro* que le traitement par le Selinexor inhibait la signalisation du BCR après stimulation par des IgM. Ils ont en effet remarqué une inhibition de la phosphorylation des protéines AKT et ERK. De plus, l'inhibition de XPO1 par le Selinexor inhibe la migration des cellules médiée par CXCL12. Enfin, l'analyse dans un modèle de souris E μ -TCL1 a permis de conclure que le traitement par le Selinexor augmentait la survie, avec une bonne tolérance du traitement. De plus, le Selinexor inhibe la prolifération et prévient l'accumulation dans la rate de cellules leucémiques¹⁹⁷.

Une dernière étude a testé la combinaison du Selinexor avec l'Ibrutinib, un inhibiteur de Btk dans les cellules de patients LLC. A noter que le séquençage des gènes *BTK* et *PLC γ 2* dans les patients étudiés n'a pas été réalisé. Ils ont pu voir que la combinaison de ces deux drogues conduisait à un effet synergique. De plus, la mutation C481S de la *BTK* qui rendait les cellules de LLC résistantes à l'Ibrutinib ne modifie pas la réponse au traitement par le Selinexor (cette partie de l'étude sur la mutation de la *BTK* a été réalisée *in vitro* par transduction lentivirale de cellules de poulet DT40 initialement KO pour la *BTK*)¹⁹⁸. Cependant, aucune étude ne s'est focalisée à l'heure actuelle sur l'effet de l'inhibition de XPO1 chez des LLC mutées pour ce gène, ou qui présentent un gain 2p (incluant *XPO1*).

II. Objectifs de thèse

Mon projet de thèse a consisté à approfondir les connaissances actuelles de la physiopathologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC). J'ai ainsi développé trois parties :

- J'ai recherché, dans le cadre d'un projet collaboratif avec l'équipe d'O Bernard (IGR, Villejuif), la cellule à l'origine du développement de la LLC. Par des approches de séquençage et de biologie cellulaire, nous avons montré que les mutations décrites dans la LLC étaient également observées dans des progéniteurs. J'ai participé à toute la partie descriptive de cette étude : séquençage direct, tris cellulaires, culture de colonies cellulaires et immunophénotypage. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Cancer Discovery* où je suis second auteur.
- Je me suis intéressé à une anomalie peu étudiée, mais observée de façon récurrente dans les LLC/SLL : la délétion du bras long du chromosome 14. Par des techniques de SNP-array (« single nucleotid polymorphism ») et de FISH (« fluorescence in situ hybridization »), nous avons recherché une région minimale de délétion afin de mettre en évidence un gène impliqué dans cette anomalie. J'ai également réalisé le séquençage des gènes fréquemment mutés dans la LLC et participé aux analyses clinico-biologiques afin de caractériser et d'évaluer la valeur pronostique de cette anomalie. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Genes, Chromosomes & Cancer* où je suis co-premier auteur.
- Enfin, mon projet principal a porté sur la caractérisation du gain du bras court du chromosome 2, anomalie fréquente et récurrente dans la LLC, mais où aucun gène candidat n'a été clairement identifié à ce jour. Cette anomalie avait déjà fait l'objet d'une première étude au sein du laboratoire, où il avait été montré que cette anomalie était fréquente dans les LLC de stades avancés, et était associée à des facteurs de mauvais pronostic. Les analyses par SNP-array nous ont permis d'identifier deux régions minimales de gain, dont l'une incluait le gène *XPO1*. J'ai étudié le rôle de ce gène dans la résistance aux drogues, que ce soit par son hyperexpression ou par mutation. Cette dernière partie de ma thèse fera l'objet d'un article qui est actuellement en cours de rédaction, et où je suis premier auteur.

III. Résultats & Discussion

I. Article 1 – Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients

Cancer Discovery, 2014, 4(9):1088-101

Dans cet article, nous avons cherché à identifier la cellule d'origine de la LLC. De plus, nous avons analysé les conséquences des mutations de deux gènes mutés de façon récurrente dans la LLC, *BRAF* et *EGR2*.

Pour réaliser cette étude, un tri cellulaire des différentes sous-populations hématopoïétiques a été réalisé afin de rechercher, par séquençage à haut-débit, dans les différentes fractions (CD3+, CD14+, CD19+/5-, CD34+) la présence des mutations retrouvées dans la fraction tumorale de patients LLC. Des xénogreffes de cellules Ba/F3 transduites avec les formes mutées des gènes *BRAF* et *EGR2* ont été réalisées chez des souris. La caractérisation phénotypique des souris ainsi que la caractérisation moléculaire des cellules transduites a permis de déterminer l'effet moléculaire des mutations de ces deux gènes. Enfin, parmi les gènes identifiés mutés de façon précoce, nous avons validé leurs fréquences dans une cohorte de patients inclus dans un protocole clinique. Ceci nous a permis de faire des corrélations cliniques et d'apporter une valeur pronostique à la présence de ces mutations.

Nous avons identifié dans les cellules progénitrices de patients LLC, différentes mutations également présentes dans les cellules leucémiques. Ces mutations présentes dans les cellules progénitrices étaient, chez certains patients, aussi présentes dans la fraction myéloïde confirmant le caractère acquis de ces mutations au niveau des progéniteurs. Parmi les gènes atteints de ces mutations dites « précoces », nous avons retrouvé des oncogènes déjà connus dans la LLC, comme les gènes *NOTCH1*, *XPO1*, ou encore *SF3B1*. Nous avons aussi identifié les gènes *BRAF*, *EGR2*, *MED12*, *MLL2* mutés de façon précoce. La prévalence de ces mutations a pu être vérifiée dans une cohorte de patients provenant d'un protocole clinique incluant des patients atteints de LLC stades B/C sans traitement préalable. Nous avons entre autres identifié des pourcentages de mutations plus élevés que dans la littérature pour les gènes *NFKB1E* (10,7%) et *EGR2* (8,3%). Par ailleurs, les patients LLC mutés pour *EGR2* étaient associés à une expression élevée du marqueur CD38 (marqueur de mauvais pronostic dans la LLC), ainsi qu'à un temps avant traitement et une survie globale sur 5 ans plus courts. Notre étude a également mis en évidence une dérégulation de la signalisation du BCR via la

caractérisation fonctionnelle des mutations affectant *EGR2* et *BRAF*. Nous avons en particulier montré que les mutations du gène *EGR2* altèrent l'expression de ces cibles. Concernant le gène *BRAF*, l'analyse *in vivo* des xénogreffes de cellules progénitrices transduites avec le mutant G469R montre un défaut de maturation des lymphocytes B avec un phénotype LLC, ainsi qu'une faible expression des IgM.

Nos résultats établissent la présence de mutations acquises non passagères (récurrentes et avec des conséquences fonctionnelles) dans des progéniteurs capables de se différencier dans les lignées lymphoïdes et myéloïdes chez les patients atteints de LLC, et montrent que la LLC se développe à partir d'une phase pré-leucémique. La détection de mutations dans des gènes comme *BRAF* et *EGR2*, dont les produits sont connus pour participer à la signalisation intracellulaire du récepteur à l'antigène des lymphocytes B, indiquent une dérégulation des phases précoces de la différenciation lymphoïde B dans les premières étapes de la LLC.

Discussion

Nous avons identifié le gène *NFKBIE* comme étant muté de façon récurrente et fréquente dans la LLC. Ce gène code pour un inhibiteur de la voie NF- κ B, et semblerait jouer un rôle dans l'activation constitutive de la voie observée dans les lymphomes et la LLC de par ces mutations^{199,200}. Plusieurs mutations géniques (*MYD88*, *BIRC3*, *NFKBIE*) ayant des conséquences sur la voie NF- κ B ont été identifiées dans la LLC, soulignant le rôle majeur de cette voie de signalisation, et l'importance de comprendre ses mécanismes de dérégulation.

Nous avons confirmé les résultats jusqu'alors débattus de Kikushige *et al.*, qui ont montré que des xénogreffes de HSC de patients LLC pouvaient entraîner des proliférations B CD5+ ayant des caractéristiques de la LLC, et suggérant que les HSC pouvaient être la cellule d'origine de la LLC. Par des analyses de séquençage à haut débit sur les différentes populations cellulaires de patients LLC, nous avons pu montrer que les mutations acquises n'étaient pas exclusivement dans les cellules tumorales matures B. Ces résultats suggèrent que les mutations présentes dans les HSC conduisent à un biais dans la différenciation B ainsi qu'au développement d'une phase pré-leucémique conduisant à la LLC. Ces données sont fondamentales et devront être prises en compte dans les stratégies thérapeutiques : à côté des traitements ciblant les cellules tumorales B, il faudra envisager des traitements spécifiques de ces cellules pré-leucémiques qui sont probablement à l'origine des rechutes inévitables de cette maladie.

RESEARCH ARTICLE

Acquired Initiating Mutations in Early Hematopoietic Cells of CLL Patients

Frederik Damm^{1,3}, Elena Mylonas^{1,3}, Adrien Cosson^{4,5}, Kenichi Yoshida^{12,15}, Véronique Della Valle^{1,3,9}, Enguerran Mouly^{1,3,9}, M'boyba Diop^{1,3}, Laurianne Scourzic^{1,3,9}, Yuichi Shiraishi^{13,14}, Kenichi Chiba^{13,14}, Hiroko Tanaka^{13,14}, Satoru Miyano^{13,14}, Yoshikane Kikushige^{16,17}, Frederick Davi^{4,5,6}, Jérôme Lambert⁷, Daniel Gautheret^{3,10}, Hélène Merle-Béral^{4,5,6}, Laurent Sutton¹¹, Philippe Dessens^{1,3}, Eric Solary^{2,3,8,9}, Koichi Akashi^{16,17}, William Vainchenker^{2,3,9}, Thomas Mercher^{1,3,9}, Nathalie Drouin^{2,3,9}, Seishi Ogawa^{12,15}, Florence Nguyen-Khac^{4,5,6}, and Olivier A. Bernard^{1,3,8,9}

ABSTRACT

Appropriate cancer care requires a thorough understanding of the natural history of the disease, including the cell of origin, the pattern of clonal evolution, and the functional consequences of the mutations. Using deep sequencing of flow-sorted cell populations from patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL), we established the presence of acquired mutations in multipotent hematopoietic progenitors. Mutations affected known lymphoid oncogenes, including *BRAF*, *NOTCH1*, and *SF3B1*. *NFKB1E* and *EGR2* mutations were observed at unexpectedly high frequencies, 10.7% and 8.3% of 168 advanced-stage patients, respectively. *EGR2* mutations were associated with a shorter time to treatment and poor overall survival. Analyses of *BRAF* and *EGR2* mutations suggest that they result in deregulation of B-cell receptor (BCR) intracellular signaling. Our data propose disruption of hematopoietic and early B-cell differentiation through the deregulation of pre-BCR signaling as a phenotypic outcome of CLL mutations and show that CLL develops from a pre-leukemic phase.

SIGNIFICANCE: The origin and pathogenic mechanisms of CLL are not fully understood. The current work indicates that CLL develops from pre-leukemic multipotent hematopoietic progenitors carrying somatic mutations. It advocates for abnormalities in early B-cell differentiation as a phenotypic convergence of the diverse acquired mutations observed in CLL. *Cancer Discov*; 4(9): 1089–1101. ©2014 AACR.

See related commentary by Jiang and Elemento, p. 995.

INTRODUCTION

Cancer develops from an individual cell that accumulates acquired mutations. Appropriate medical care requires thorough understanding of the natural history of the disease, including the identification and order of occurrence of the mutations, the cell of origin, and the clonal organization

of the tumor cells. In addition, because the transformation process can capture preexisting somatic mutations (1, 2), their driver nature needs to be fully established, based on their recurrence and their functional consequences. Such in-depth investigations identify initial driver mutations, which are relevant as targets for therapy.

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most frequent adult leukemia in Western countries, is characterized by an accumulation of mature B lymphocytes (3). The CLL tumor cells are clonal, as assessed by rearrangement of the immunoglobulin heavy chain (*IGH*) gene, and express low levels of surface B-cell receptor (BCR). In a fraction of patients, the *IGH* variable gene segment (*IGHV*) rearrangement is mutated, reflecting normal somatic hypermutation triggered by antigen recognition. Patients with *IGHV* mutations have a better prognosis than those without *IGHV* mutations.

Investigation of CLL samples by massively parallel sequencing has identified a number of acquired somatic mutations (4, 5), but no individual gene is mutated in more than 20% of the patients. The products of these mutated genes are involved in RNA metabolism, genome stability and cell cycle, control of the Notch pathway, Wnt signaling, and inflammation (4). Transformation may also depend on specific *IGH* rearrangements and BCR intracellular signaling cascades (6, 7). The cell of origin of CLL is currently debated. Immunophenotype and expression profiling analyses pointed at mature CD5⁺ B cells (8), but the involvement of early hematopoietic cells in CLL development has been emphasized in xenograft experiments, which showed that the hematopoietic stem/progenitor cells from patients with CLL show biased and abnormal differentiation toward the B-lymphoid lineage in immunodeficient mice (9).

To investigate the natural history of CLL, we embarked on a thorough analysis of CLL samples using massive parallel sequencing and cellular analyses.

Authors' Affiliations: ¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U985; ²INSERM U1009; ³Institut Gustave Roussy, Villejuif; ⁴INSERM U1138; ⁵Université Pierre et Marie Curie-Paris 6; ⁶Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, APHP; ⁷Université Paris Diderot, Hôpital Saint-Louis, SBIM; ⁸Ligue Nationale Contre le Cancer, Equipe labellisée, Paris; ⁹Université Paris-Sud; ¹⁰Université Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, CNRS UMR 8621, Orsay; ¹¹Service d'Hématologie Clinique, Centre Hospitalier Victor Dupouy, Argenteuil, France; ¹²Cancer Genomics Project, Graduate School of Medicine; ¹³Laboratory of DNA Information Analysis and ¹⁴Laboratory of Sequence Data Analysis, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo; ¹⁵Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto; ¹⁶Medicine and Biosystemic Science; and ¹⁷Center for Cellular and Molecular Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan

Note: Supplementary data for this article are available at *Cancer Discovery* Online (<http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/>).

F. Damm and E. Mylonas contributed equally to this article.

S. Ogawa, F. Nguyen-Khac, and D.A. Bernard share senior authorship of this article.

Corresponding Authors: Olivier A. Bernard, INSERM U985, 39 rue Camille Desmoulins, Villejuif 94805, France. E-mail: olivier.bernard@inserm.fr; Florence Nguyen-Khac, Unité de Cytogénétique Hématologique, Service d'Hématologie Biologique, GH Pitié-Salpêtrière/Charles Foix, 83 Bd de l'Hôpital, Paris 75013, France. E-mail: florence.nguyen-khac@pslaphp.fr; and Seishi Ogawa, Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. E-mail: sogawa-tky@umin.ac.jp

doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0104

©2014 American Association for Cancer Research.

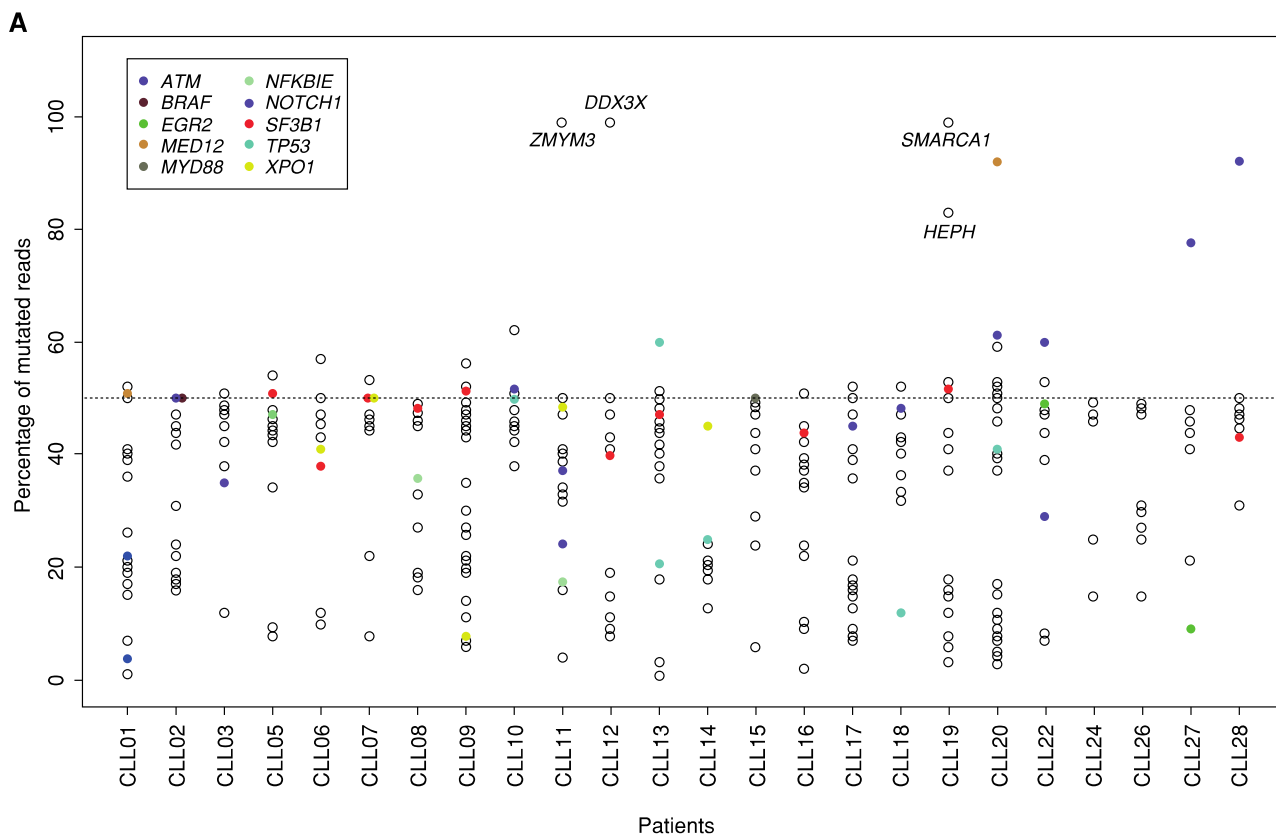


Figure 1. Somatic mutations identified in 24 patients with CLL. **A**, variant allele frequencies in the tumor fraction. Genes analyzed in the extension cohort are colored. *ZMYM3*, *DDX3X*, *SMARCA1*, *MED12*, and *HEPH* genes are on chromosome X. See Supplementary Table S1 for details. The patient numbers are in abscissa. (continued on following page)

RESULTS

***SF3B1* Mutations Are Detected in Nonlymphocytic Cellular Fractions of CLL Patients**

To search for CLL mutations in the hematopoietic progenitor cell fraction, we first investigated the distribution of *SF3B1* mutations in the hematopoietic tree of patients with *SF3B1*-mutated CLL, because this gene is frequently mutated in both CLL and myelodysplastic syndrome (MDS), a chronic stem cell-derived myeloid tumor (10, 11). Sanger sequencing of the mutational hotspots in the *SF3B1* gene using DNA from 50 patients with CLL identified 7 patients carrying an *SF3B1* mutation. We next flow-sorted cells according to the expression of mutually exclusive cell-surface markers: CD34 (which marks the immature progenitor cells compartment at the apex of hematopoietic differentiation), and markers of mature cells, including CD3 (T cells), CD14 (monocytes), and CD19 (both normal and tumor B cells). Sequencing analyses of DNA from these cellular fractions showed wild-type *SF3B1* sequences in the CD3⁺ cells and the mutated *SF3B1* sequence in the CD19 fraction in all seven cases. The mutation was also observed

in the CD34⁺ and/or CD14⁺ fractions in two patients (Supplementary Fig. S1), suggesting it was acquired in these patients in an early progenitor cell that was able to participate in both lymphoid and myeloid differentiation.

Acquired Mutations Are Detected in Multipotent Progenitors in the Majority of CLL Patients

We next used whole-exome sequencing of DNA from flow-sorted cell populations derived from 24 patients with CLL (17 *IGHV*-unmutated and 7 *IGHV*-mutated; Supplementary Table S1). Results of the *IGH* gene rearrangements were always compatible with monoclonal proliferation. Viable cells were flow-sorted to purities greater than 96% (see flow chart description; Supplementary Fig. S2A and S2B). Comparison of exome sequences from tumor cells and T lymphocytes (essentially spared by CLL mutations as shown for *SF3B1* mutation) identified a total of 415 somatic mutations predicted to result in protein-coding changes in 361 different genes with a median of 17 mutations/patient (range, 7–34; Supplementary Table S1; Fig. 1A). Some mutations were present in virtually all CD19⁺ cells, whereas the allelic ratio of other mutations showed that they were present only

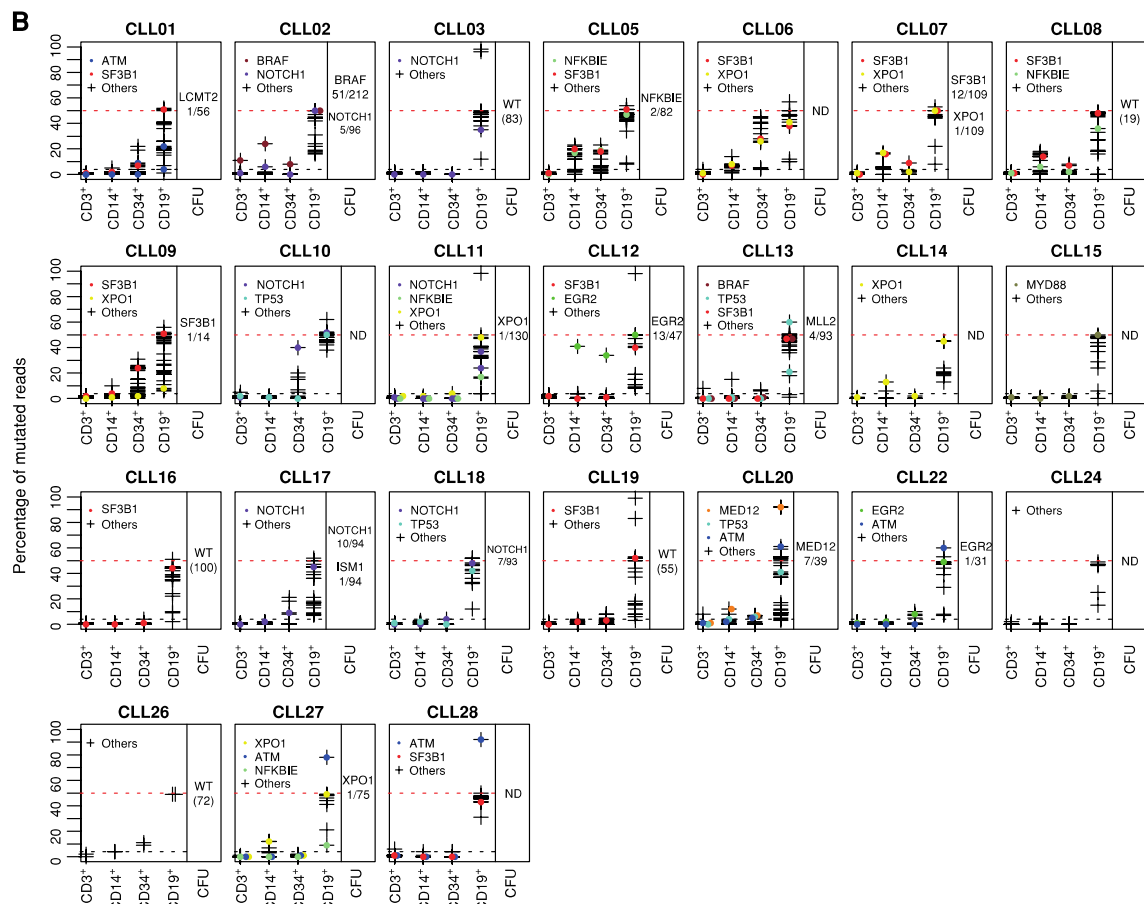


Figure 1. (Continued) B, variant allele frequencies in the hematopoietic fractions, sorted on the basis of the cell-surface expression of the following antigens (in abscissa): CD34 (progenitors), CD3 (T cells), CD19 and CD5 (tumor cells), and CD14 (monocytes). Column on the right, the genotyping of colony forming units (CFU) from single CD34⁺ cells. If only wild-type (WT) colonies were observed, the number of analyzed colonies is indicated in parentheses. The ratio of 50% and 4% are indicated by dotted lines, orange and black, respectively. ND, not done.

in a fraction of these cells, indicating that they were secondarily acquired.

We used targeted deep resequencing to simultaneously validate and quantify the mutation burden in DNA from the sorted fractions (Fig. 1B and Supplementary Table S1). Sorting impurity and aberrant antigen expression should be taken into account when analyzing cell-sorted fractions. Mutation burdens below 4% that potentially result from sorting contamination were regarded as negative. Among the 24 patients analyzed, only 3 (CLL03, 15, and 24) were devoid of mutations in the CD34⁺ progenitor or the CD14⁺ monocyte fractions. All 3 patients carry mutated *IGHV* rearrangements in their CLL cells. In the other 21 patients, at least one mutation was detectable in the CD14⁺ or in the CD34⁺ fractions. Two patients (CLL14 and 27) showed mutations in the CD14⁺ and not in the CD34⁺ fraction and, conversely, 6 patients (CLL10, 11, 16, 17, 18, and 22) showed mutation in the CD34⁺ but not in the CD14⁺ fraction. In 13 samples (CLL01, 02, 05, 06, 07, 08, 09, 12, 13, 19, 20, 26, and 28), at least one mutation was detected in both fractions. The presence of a CLL mutation in immunophenotypical progenitor

(CD34⁺) or myeloid (CD14⁺) primary cells confirmed the involvement of immature cells in CLL pathogenesis. The burden of mutations detected in the immature hematopoietic cells (referred to hereafter as early mutations) was always among the highest mutation burdens in CLL cells, consistent with their occurrence at the initial steps of CLL development. However, in all patients only a subset of the CLL mutations was observed in the progenitors or myeloid fractions.

Because cell-surface expression of myeloid antigens is not sufficient to attest to the myeloid nature of a progenitor cell, we next tested the myeloid differentiation capacities of the mutated progenitors. We sorted single CD34⁺CD19[−] progenitor cells and grew them *in vitro* in myeloid conditions. Viable cells were available for 18 patients. The cloning efficiency was close to 60% for each patient (exceptions were CLL08 and CLL09) and colonies were confirmed as myeloid (erythroid, megakaryocytic, or/and granulo-monocytes) by FACS immunophenotyping of randomly chosen colonies. Colony genotyping confirmed the presence of CLL mutations in myeloid cells in 13 patients, whereas 5 patients (CLL03, 08, 16, 19, and 26) did not show mutated colonies

(Fig. 1B and Supplementary Table S1). Although the absence of mutation may be due to the low number of colonies in some patients (as for patient CLL08), the other 4 patients clearly did not show mutated cells in over 50 colonies analyzed. In addition, the frequency of mutated colonies differed from the estimated mutation burden in the sorted CD34⁺ fractions, supporting the idea that not all mutated progenitors could grow in these myeloid culture conditions. We also investigated the myeloid colonies from 17 patients for the presence of the CLL *IGH* rearrangement using rearrangement-specific PCR. No *IGH*-rearranged colonies were detected for 11 patients (CLL01, 02, 03, 08, 09, 11, 12, 13, 16, 20, and 26). A low number of *IGH*-rearranged colonies was observed for 6 patients: CLL05 (8/96), 07 (2/109), 17 (1/96), 27 (2/96), 18 (3/96), and 19 (1/59). Nucleotide sequence analyses showed that the variable joining gene segments (VJ) junction amplified from the colonies matched the tumor cell rearrangement in patients 05 and 07. Colonies from patients 17 and 19 showed a rearrangement differing from those of their CLL counterpart. Half of the colonies from patients 18 and 27 showed the same rearrangement as the corresponding tumor cells, whereas the other half carried other VJ junctions. Of note, every VJ-positive colony also carried an early mutation.

Together, these data demonstrate the presence of CLL mutations in a multipotent hematopoietic progenitor fraction in the majority of patients with CLL. Reasoning that the mutations had been originally acquired in a single cell, the high proportion of mutated cells in the CD34⁺ or CD14⁺ fractions demonstrates that the cell carrying the identified mutation had some clonal advantage and accumulated over time. The mutations seem to variably affect hematopoietic differentiation, as judged from the mutation burden detected in the hematopoietic fractions (see Supplementary Fig. S3A).

Some patients showed an overall normal balance between myeloid and B-lymphoid differentiation. They showed multilineage involvement indicative of an unbiased differentiation of the mutated stem/progenitor cells (for example, CLL02, 07, 12, and 20 in Fig. 1B and Supplementary Table S1). In our settings, a mutation would be detected only if it induces the accumulation of the mutated cell in the given fraction. If a mutation induces accumulation at a late step and not at early steps of differentiation, accumulation will occur in the mature cells (CD14⁺) and not the immature cells (CD34⁺). For example, patients CLL14 and CLL27 would belong to this first group of patients.

A second type of patient (for example, CLL10, 11, and 22) shows an unbalanced involvement of myeloid cells (a lower mutational burden than in CD34⁺ progenitors), suggesting that the early mutations bias the mutated stem/progenitor cells toward the lymphoid lineage or specifically allow the accumulation of lymphoid-primed progenitors.

A third type of patient (CLL03, 15, and 24 in this series) lacks detectable mutation in either the myeloid or the progenitor compartments, suggesting either a strict commitment toward lymphoid differentiation or the involvement of a lymphoid-primed progenitor. Alternatively, these patients may follow a different transformation pathway. The numbers and burden of mutations did not differ statistically between these 3 patients and the others (Supplementary Table S1).

Early Mutations Affect Genes Recurrently Mutated in CLL and Other Malignancies

Mutations detected in the progenitors of patients with CLL affected genes already known to be mutated in CLL, in other hematologic malignancies, or even in other cancers, supporting their active role in transformation (Supplementary Table S2). Early mutations were observed in the *NOTCH1*, *SF3B1*, *TP53*, and *XPO1* genes are among the most frequently mutated genes in CLL (4, 5, 12). Genes such as *BRAF* and *MLL2* are mutated in CLL and in other B-cell malignancies (13–15). A few *EGR2*- and *NFKBIE*-mutated patients have been reported in CLL (4, 5, 16). To further establish the importance of the early mutations identified in our patients, we investigated the recurrence of some of them by direct Sanger sequencing of the mutational hotspots of *BRAF*, *EGR2*, *MED12*, *MYD88*, *NFKBIE*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *TP53*, and *XPO1* in the 168 untreated patients with stage B and C CLL who were sampled at inclusion in a clinical trial (www.clinicaltrials.gov, NCT00931645; Supplementary Table S3; ref. 17). A total of 113 mutations in 84 patients were identified, and 84 of 168 (50.0%) patients presented with at least one mutation of this nine-gene panel (Fig. 2A and B and Supplementary Table S4). Inactivating mutations of *NFKBIE* were found in 10.7% (18 of 168; Fig. 2C) of the patients. Missense mutations of *EGR2* were observed in 8.3% (14 of 168; Fig. 2C) of the patients and associated with higher CD38⁺ expression (median, 70% vs. 17%; *P* = 0.009), a known poor prognosis marker, a shorter time to treatment (median, 15.4 vs. 1.2 months; *P* = 0.0006), and a shorter 5-year overall survival (56.2 vs. 80.4 months; *P* = 0.04; Fig. 2D).

Deregulation of BCR Signaling as a Phenotypic Convergence of Early Mutations in CLL

Normal BCR and pre-BCR signaling occurs through *BRAF*, which activates ERK proteins (18), which in turn phosphorylate and activate the ternary complex factor–serum response factor (SRF) dimer, resulting in the upregulation of a set of immediate early genes, including *EGR2* (19, 20). *BRAF* and *EGR2* mutations may therefore affect the BCR signaling, which is abnormal in CLL (7). *BRAF* mutations, most frequently V600E, have been described in a variety of human malignancies, including hairy cell leukemia (13, 21), another malignant B-cell disease. In CLL, *BRAF* mutations target amino acids located in the P-loop of the kinase (Supplementary Table S4; ref. 22), leading to weaker activation than the canonical V600E mutations (18). Ectopic expression of the CLL-mutant *BRAF*-G469R in Ba/F3 cells showed a constitutive ERK phosphorylation and *Egr2* transcription (Fig. 3A and B). To analyze the impact of *BRAF*-G469R in B-cell differentiation, we transduced hematopoietic progenitors with *BRAF*-wild-type (WT), *BRAF*-G469R, or empty murine stem cell virus (MSCV) vector and engrafted the cells in irradiated syngeneic recipients. Animals were analyzed after 5 weeks, before the onset of any gross hematologic disorders. Careful analyses of the immunoglobulin M (IgM)-positive B-cell compartment showed a decrease in the proportion of B cells in the *BRAF*-G469R mice, as compared with MSCV or *BRAF*-WT mice (Fig. 3C and D). In addition, the mean fluorescence of IgM was significantly lower in B220-IgM-positive *BRAF*-G469R-expressing cells than in their WT or MSCV counterparts (Fig. 3E). A similar abnormal (IgM low, IgD⁺) B-cell population was present in the spleen of the *BRAF*-G469R mice (Fig. 3C and E).

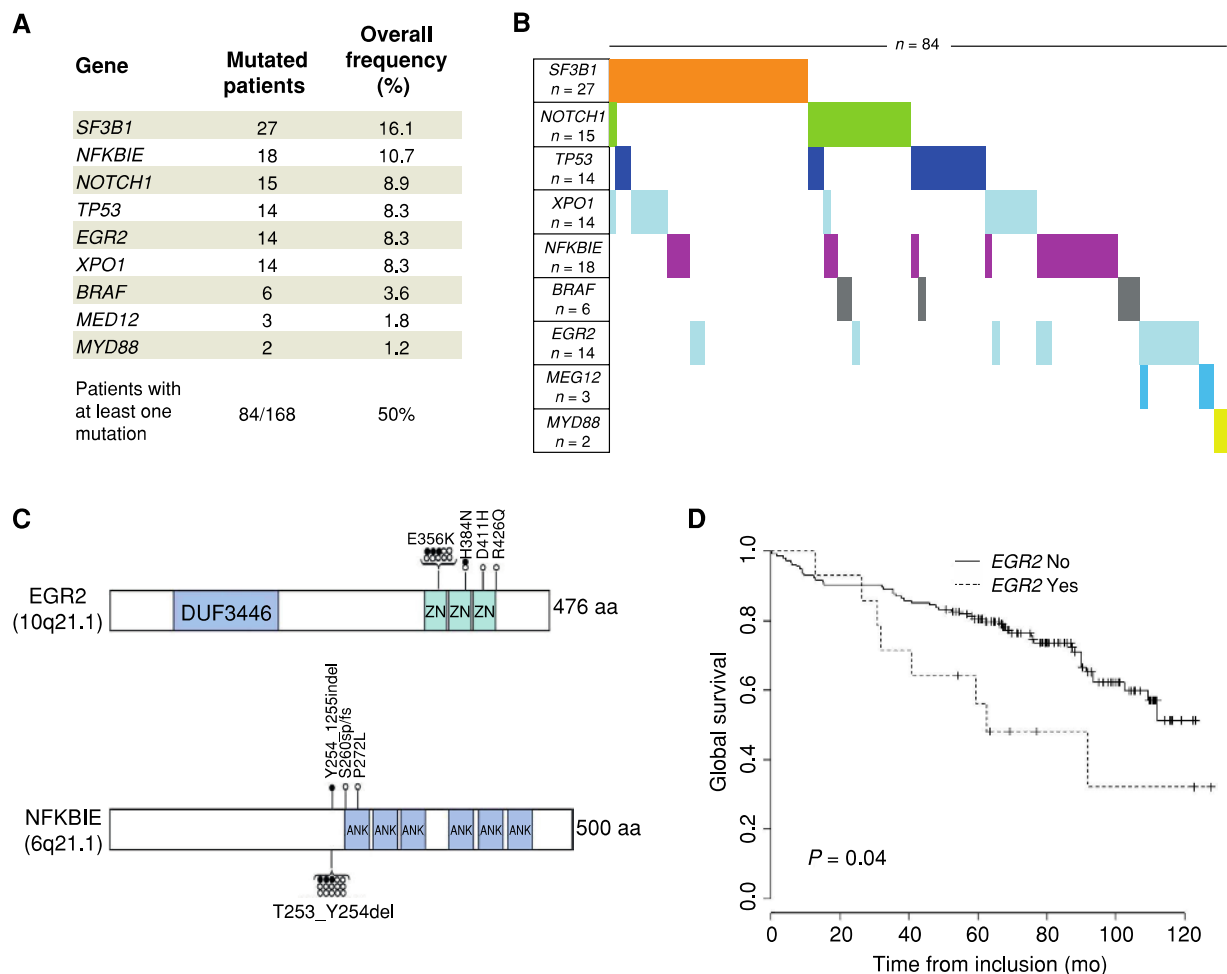


Figure 2. Gene mutation profile in 168 patients with CLL. Frequencies (**A**) and distributions (**B**) of identified mutations. **C**, localization of identified mutations in *EGR2* and *NFKBIE* proteins. Circles, mutations; filled circle, proven somatic mutation. **D**, overall survival of patients with CLL according to *EGR2* mutation status (log-rank test).

We next investigated the consequences of *EGR2* mutations. The *EGR2* gene encodes a versatile transcription factor that participates in the control of cellular differentiation, including myeloid (23), B-lymphoid, and T-lymphoid differentiation (24, 25). All *EGR2* mutations identified in CLL were heterozygous missense mutations, and, with the exception of R426Q, were located within the zinc-finger domains (Fig. 2C). In addition, *EGR2* mutations were detected as early molecular events in 2 patients (CLL12 and CLL22; Fig. 1B and Supplementary Table S1).

To investigate the functional consequences of *EGR2* mutations, we first expressed GST fusion proteins, including the zinc-finger region of WT or two *EGR2* mutants (E356K and H384N). Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) using a biotinylated probe corresponding to a high-affinity *EGR2* site (26) showed specific binding of the WT and the H384N proteins (Fig. 4A), although H384N binding seemed weaker than WT despite comparable protein amounts (Fig. 4B). The interaction of the E356K protein with the probe was not observed in this assay. To investigate their ability to regulate

transcription, we expressed the WT and the mutant forms of *EGR2* in the murine multipotent hematopoietic cell line EML. Expression levels of all *EGR2* isoforms were comparable (Fig. 4C) and were associated with slower growth (Fig. 4E). Cells expressing WT *EGR2* showed a progressive reduction in the expression of the cell-surface markers B220 (B lymphoid) and Gr1 (myeloid; Fig. 4D). Growth slowdown and loss of B220⁺ and Gr1⁺ cells occurred even faster in cells expressing mutant *EGR2* (Fig. 4D and E), indicating that the mutations had a functional impact. We investigated the expression of known *EGR2* target genes using RNA obtained from sorted GFP⁺ cells, 3 days after transduction, to detect primary transcriptional changes induced by *EGR2* expression. As shown in Fig. 4F, WT and mutated *EGR2* proteins interfered with the expression of *EGR2* targets. The effects of the three *EGR2* proteins were similar on *Csf1* transcription, whereas WT-*EGR2* was stronger than E356K, which was stronger than H384N, in the transactivation of *Gadd45b*. Taken together, these results indicate that the *EGR2* mutations in CLL do not functionally inactivate the protein but rather affect the

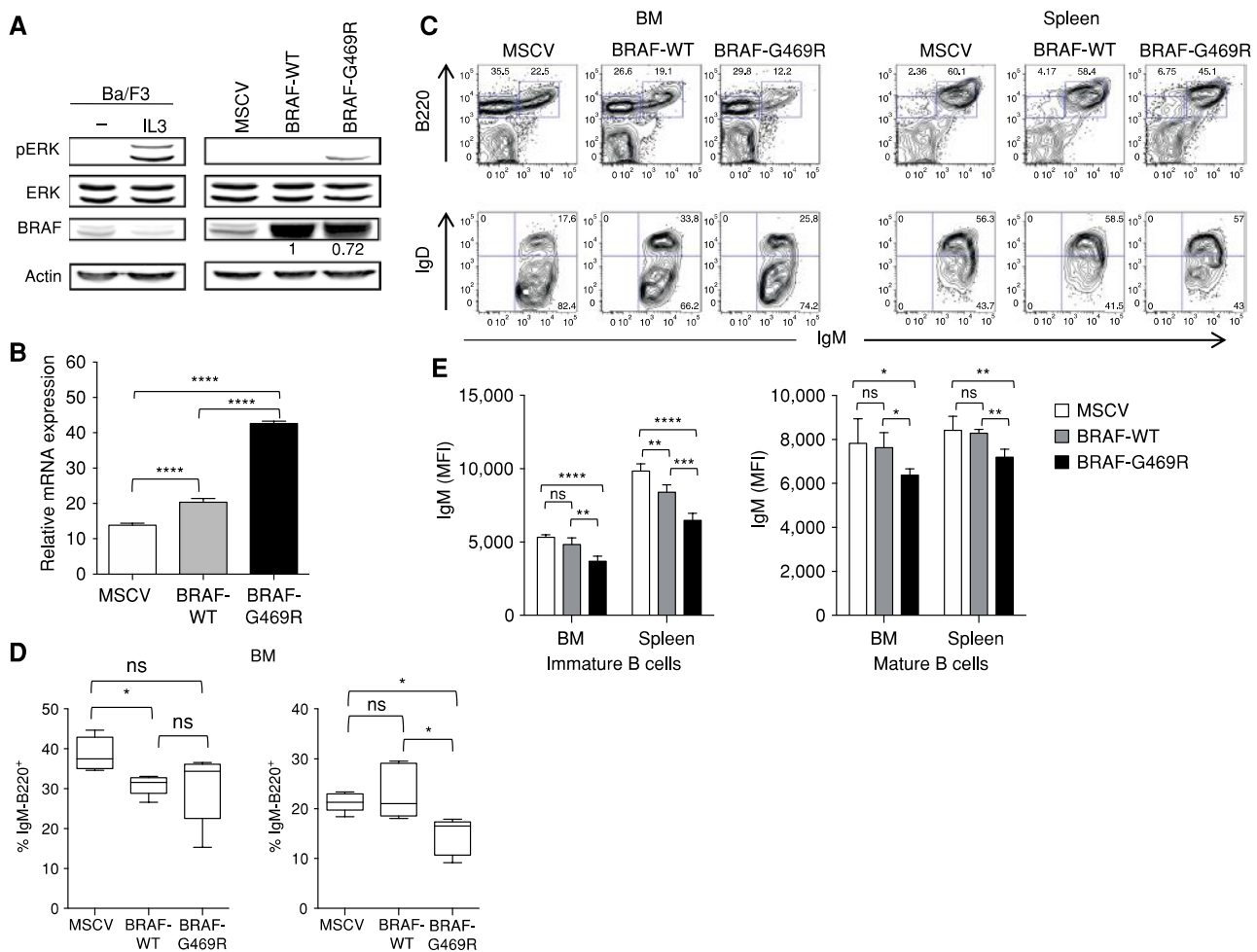


Figure 3. Functional analyses of BRAF-G469R. **A**, expression of BRAF-G469R from MSCV results in constitutive ERK activation. Right, ERK phosphorylation was detected in IL3-starved Ba/F3 cells expressing mutated BRAF, but not BRAF-WT or empty control. Antibodies are indicated and BRAF expression normalized to β -actin and BRAF-WT expression. **B**, real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) evaluation of *Egr2* expression in transduced Ba/F3 cells, normalized with respect to *Gapdh*. **C**, representative FACS analysis of bone marrow (BM; left) and spleen (right) cells from MSCV, BRAF-WT, and BRAF-G469R mice analyzed 5 weeks after engraftment. Plots are gated on donor (CD45.2⁺) GFP⁺ cells and the percentages of gated cells are shown. **D**, mean percentage (\pm SD; $n = 5$ mice) of bone marrow GFP⁺ donor cells expressing B220 and negative (left) or positive (right) for membrane IgM. **E**, mean fluorescence intensity (MFI) of IgM in GFP⁺ donor B cells, immature (IgM⁺ IgD⁻; left) and mature (IgM⁺ IgD⁺; right). BM or spleen origin is indicated (****, $P < 0.0001$; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$; ns, $P > 0.05$).

transcription of EGR2 target genes. Whether the differential activities of the mutants are due to differences in DNA binding or interaction with transcription cofactors at target genes will require additional investigation.

To investigate the functional consequences of *EGR2* mutations in patient samples, we analyzed RNA-seq data obtained from 16 CLL samples. Fifteen genes were downregulated, whereas 224 genes were specifically upregulated in EGR2-E356K samples ($n = 4$) as compared with EGR2 WT or unanalyzed patients ($n = 10$; $P < 0.01$; Supplementary Table S5). Hierarchical clustering using the 224 upregulated genes showed clustering of all 5 *EGR2*-mutated CLL samples, including the EGR2-H384R sample (Fig. 5A). An additional sample, which was not analyzed by exome sequencing and lacked acquired mutations in *EGR2*, clustered together with the EGR2-mutated samples, suggesting that other alterations mimic the effect of *EGR2* mutations. To investigate whether the differentially

expressed genes might be direct EGR2 targets, we used ChIP-seq data obtained from primary human monocyte extracts via chromatin immunoprecipitation with anti-EGR2 antibodies (27). Peaks were observed close to 168 of the 224 upregulated genes, indicating that these genes were likely directly regulated by EGR2 ($P < 0.001$; see Supplementary Table S5 and Methods). To further investigate this point, we used publicly available CLL expression data (28) to identify 24 predicted EGR2 target genes using the Algorithm for the Reconstruction of Accurate Cellular Networks (ARACNe; see Methods and Supplementary Table S6). When used as a surrogate marker of EGR2 transcriptional activity, this signature showed transcriptional activity in *EGR2*-mutated samples (Fig. 5B). Together, these data confirm that expression of mutated EGR2 proteins interferes with the expression of EGR2 target genes *in vivo*.

Because EGR2 is downstream of normal BCR signaling, we next determined a BCR signaling signature. For this purpose,

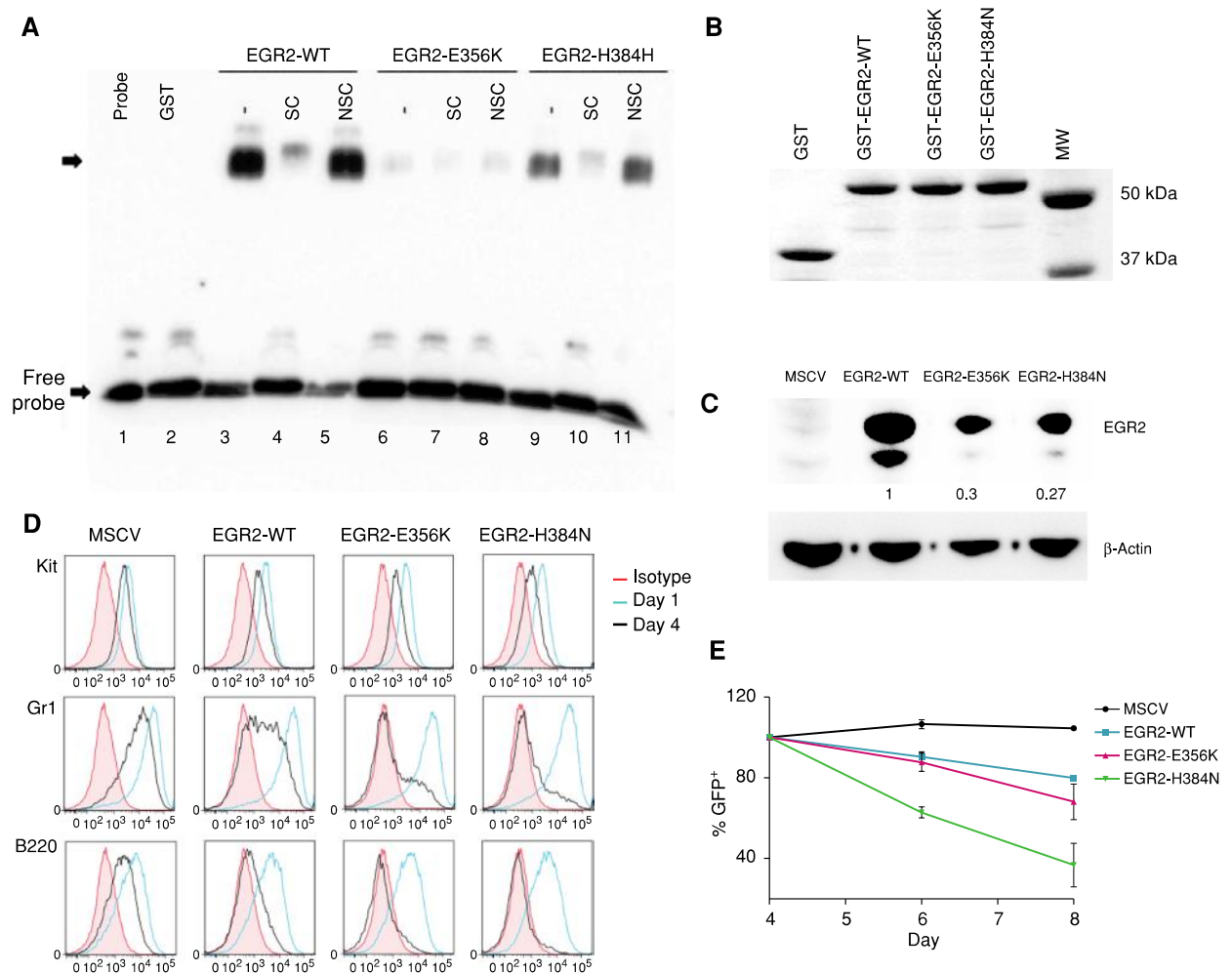


Figure 4. Functional analyses of EGR2 mutants. **A**, the zinc-finger regions of mutant EGR2 are less efficient than WT at binding EGR2 high-affinity sequences (CTCTGTACGCGGGGCGGTTA) in EMSA. Shifted complexes (indicated by an arrow) are observed in lanes containing GST-EGR2-WT protein (lanes 3 and 5). Formation of this complex is inhibited in the presence of a 200-time molar excess of unlabeled probe used as specific competitor (SC; lanes 4, 7, and 10), but not in the presence of the same excess of a nonspecific competitor (NSC; lanes 5, 8, and 11). Shifted complexes are also detected in lanes corresponding to GST-EGR2-H384N (lanes 9 and 11), but are virtually absent in lanes corresponding to GST-EGR2-E356K (lanes 6 and 8). Lane 1, probe only; lane 2, native GST protein. **B**, qualitative and quantitative assessment of native and fusion GST proteins. MW, molecular weight markers. **C**, Western blot analyses using EGR2-specific antibodies show comparable levels of expression in transduced cells. Ratio was normalized to β-actin and EGR2-WT expression. **D**, expression of EGR2 proteins is associated with a decrease of Gr1 and B220 membrane expression. Analyses were gated on GFP⁺ cells. FACS analysis at day 1 (blue) and day 4 (black) posttransduction are shown. **E**, growth curve showing EML cells transduced by the indicated vector. Monitoring the proportions of GFP⁺ cells shows a decrease in the proportion of cells expressing WT and mutant EGR2 proteins, with a stronger decrease for the mutants. (continued on following page)

we defined a set of genes upregulated upon BCR stimulation of normal B cells, using available data (29, 30), and used Gene Set Enrichment Analyses (GSEA) to show that this signature is enriched in *EGR2*-mutated samples, with respect to non-mutated samples (Fig. 5C and D). Reciprocally, the *EGR2*-E356K signature was markedly enriched in BCR-stimulated samples, when compared with unstimulated B cells (Fig. 5E and F), further establishing the deregulation of intracellular BCR signaling in *EGR2*-mutated samples.

DISCUSSION

Here, we identified acquired mutations in the hematopoietic progenitors of patients with CLL and provided proof-of-

principle for the role of these mutations during the natural history of the disease.

Our data identified early-mutated genes in patients with CLL. The high mutation burden observed in some patients, in the progenitor and/or mature myeloid fractions, underscores the notion that the identified mutations are functionally relevant and lead to the accumulation of mutated cells, in the progenitor and/or mature fractions. Some of those early drivers are well-known CLL oncogenes (i.e., *NOTCH1*, *XPO1*, and *SF3B1*). We also identified recurrent inactivating mutations of the *NFKBIE* gene in 10% of patients and as an early event in 1 patient. *NFKBIE* encodes an inhibitor of NF-κB activity with a specific role in B-lymphocyte biology (31–33). In addition, we showed that acquired missense

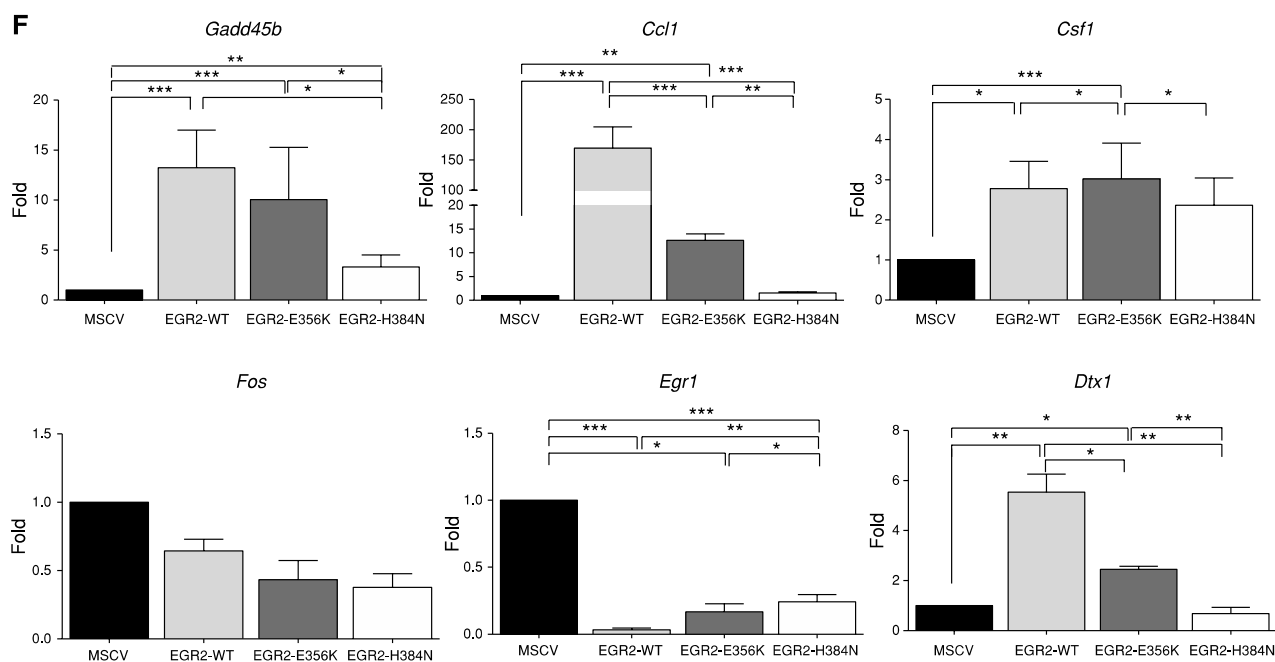


Figure 4. (Continued) F, transcriptional modulation of endogenous EGR2 target genes in transduced cells. Expression was normalized with respect to GAPDH and expression in empty vector (MSCV) transduction (****, $P < 0.0001$; ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$). Only significant differences (<0.05) are shown.

mutations of the EGR2 transcription factor are associated with a negative prognostic impact on patient outcome and occurred as an early event in 2 patients with CLL.

Our functional data and global expression analyses also point at a common functional consequence of several mutations found in human CLL. EGR2 mutations alter the transcriptional activity of the protein to different extents depending on the mutation. A similar variability has also been observed for the EGR2 mutants observed in congenital neuropathies (34, 35). *EGR2* is a downstream target of the BCR and pre-BCR complexes, through an intracellular signaling cascade involving BRAF, ERK, ELK-SRF, and finally upregulation of *EGR2* transcription (19). EGR2 plays an important role in the fine-tuning of early B-cell differentiation (19, 24, 36, 37). Expression of a CLL BRAF mutant in murine progenitors induced abnormal B-cell maturation in mice, including low expression of IgM, a feature of human CLL. Abnormal BCR signaling and EGR2 deregulation are observed in CLL (7, 30, 38), and our observations provide a molecular basis for these observations. We have not been able to investigate the involvement of the progenitor fractions in our series of patients. In a different patient with CLL relapsing from allograft treatment, we have detected an acquired *SF3B1* mutation in the lymphoid-primed multipotent progenitor fraction (defined by expression of CD34⁺/CD38⁺/CD45RA⁺/CD90⁺; ref. 39; Supplementary Fig. S3B). Together with a previous report of differentiation bias of CLL progenitor cells in xenograft experiments (9), our results suggest that abnormalities in hematopoietic progenitors and early B-cell differentiation are an early step during CLL pathogenesis. They also support the hypothesis that early

CLL mutations, despite their diversity, show a convergent phenotype through the impairment of B-cell differentiation upon deregulation of (pre-)BCR signaling. CLL would then develop from progenitors undergoing aberrant B-cell differentiation.

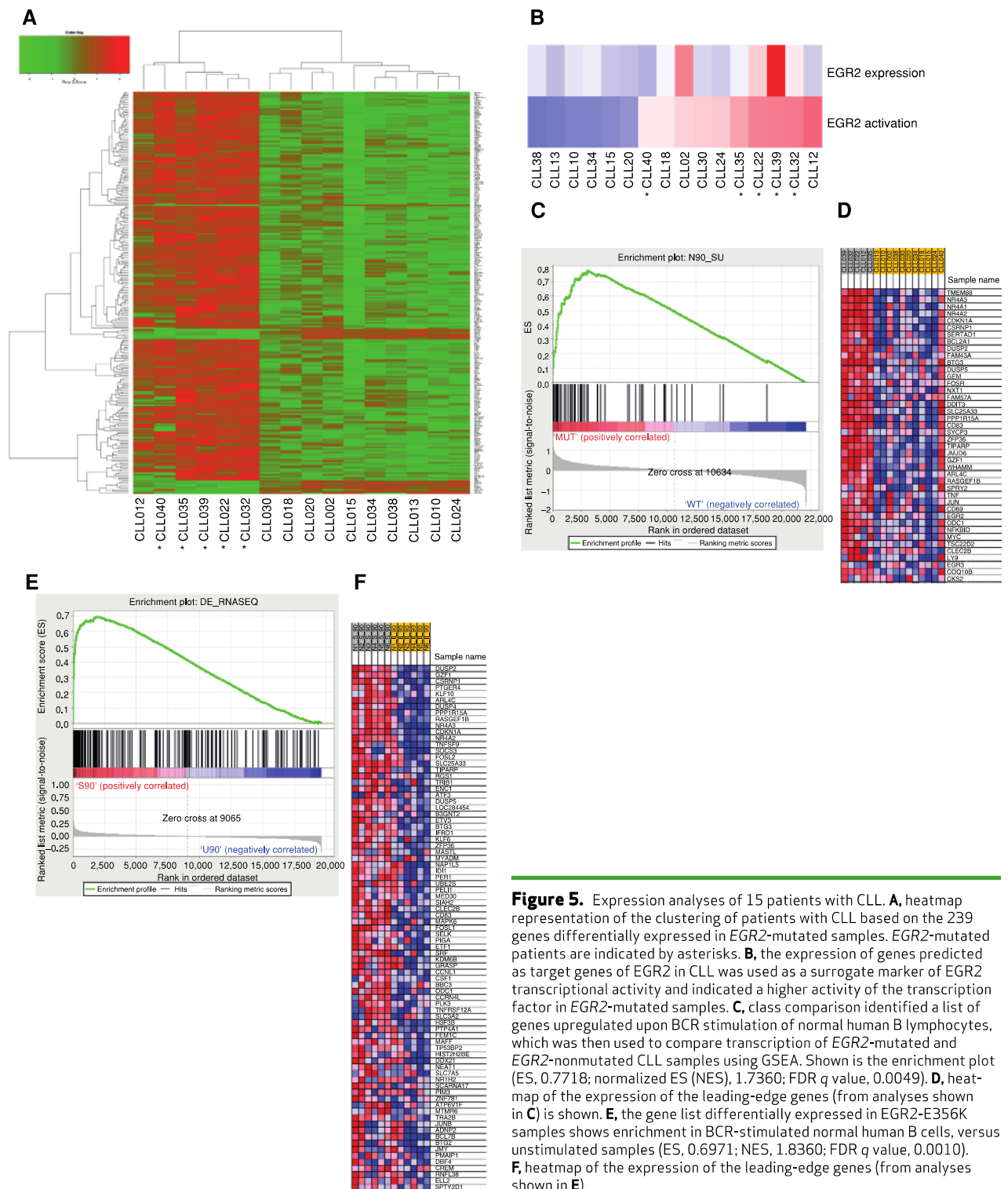
Finally, the diverse early CLL mutations may all induce a pre-leukemic stage devoid of overt clinical signs, conceptually similar to the one proposed for acute leukemia or observed in chronic myeloid neoplasms (1, 2). These observations may therefore have an impact on the follow-up and treatment of patients with CLL. It will therefore be important to understand how these findings relate to the clinical evolution of the patients and to what extent they also apply to other mature lymphoid malignancies (40–43).

METHODS

Patient samples were provided by the tumor bank at Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France), and the study was performed under the supervision of Institutional Review Boards of the participating institutions. Samples were chosen on the basis of the availability of sufficient viable cells. Patients gave informed consent according to the declaration of Helsinki and most of them were enrolled in a clinical trial (www.clinicaltrials.gov, NCT00931645; ref. 17).

Statistical Analysis

Clinical and laboratory variables were compared across patients with or without mutation using the Wilcoxon rank-sum test (for quantitative variables) or the Fisher exact test (for qualitative variables). Time to treatment was defined as time between diagnosis and first treatment and compared across groups using the Wilcoxon



rank-sum test. Overall survival was defined as survival since study enrollment; a Kaplan–Meier estimator was used and survival curves were compared using the log-rank test. All tests were two-sided, with *P* value less than 0.05 considered as statistically significant. The SAS 9.3 (SAS, Inc.) and R 3.0.2 (R Development Core Team, 2006) software packages were used.

Exome Sequence Analyses

We used sorted CD19⁺ tumor cells (and CD5⁺ when appropriate) and nontumor (CD3⁺) cells to extract DNA for exome capture with the SureSelect V4 Mb All Exon Kit (Agilent Technologies) following the standard protocols. We performed paired-end sequencing (100 bp) using HiSeq2000 sequencing instruments at IGR or University of Tokyo. We mapped reads to the reference genome hg19 using the Burrows–Wheeler Aligner (BWA) alignment tool version 0.5.9. PCR duplicates were removed using SAMtools (0.1.18). The detection of candidate somatic mutations was performed according to the previously described algorithms with minor modifications (44). Briefly, the number of the reads containing single-nucleotide variations (SNV) and indels in both tumor and reference samples was enumerated using SAMtools, and the null hypothesis of equal allele frequencies between tumor and reference was tested using the two-tailed Fisher exact test. For candidate somatic mutations, those variants were adopted as candidate mutations whose *P* value was <0.01 and allele frequency was <0.1 in the reference sample. Finally, the list of candidate somatic mutations was generated by excluding synonymous SNVs and other variants registered in either dbSNP131 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) or an in-house SNP database constructed from 180 individual samples (Genomon-exome: <http://genomon.hgc.jp/exome/en/index.html>) as previously described (44).

RNA Sequencing, Mapping, and Identification of Differentially Expressed Genes

RNA was extracted from flow-sorted CD19⁺ fraction using Qiagen columns, based on material availability. The cDNA libraries were prepared using the ScriptSeq Complete Kit (Epicentre). We performed paired-end sequencing as described for exome analysis. We removed ribosomal RNA reads (average 2, 11% of total reads) using alignment to the GenBank database. We removed low-quality bases and adapters using Trimmomatic version 0.32. The remaining paired reads were mapped to the human reference genome hg19 using Tophat aligner version 2.0.9. The mapped reads were sorted according to their name using SAMtools version 0.1.18. We used the HTSeq python library version 0.5.4p5 to count the number of reads per gene based on the gtf annotation file from the UCSC browser (hg19; ref. 45). Genes with no count in all the samples were discarded and technical replicates were summed. Read numbers and normalization were performed using DESeq version 1.14.0 in the R environment version 3.0.2. To test for differential expression between EGR2 WT (10 samples) and EGR2-E356K (four samples), we used the R package DESeq with negative binomial distribution and a shrinkage estimator for the distribution's variance. *P* values (adjusted by the Benjamini and Hochberg procedure) lower than 1×10^{-2} and fold changes higher than 2 were considered significant. Genes located on sex chromosomes were not considered.

GSEA Analysis

The CEL files of the GSE39411 (30) and GSE22762 (28) sets have been normalized with a Robust Multi-Array Average (RMA) procedure. A list of 63 genes was obtained from normalized GSE39411 by a Class Comparison at a *P* value of 0.001 with BrB Array Tools (<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>) by comparing IgM-stimulated and unstimulated normal B cells at 90 minutes.

A first GSEA analysis was performed by comparing this signature with the log₂ expression of RNA-seq data of patients with CLL with and without an EGR2-E356K mutation. Reciprocally, a second GSEA analysis was performed by comparing the 239 genes signature obtained by differential expression of genes (Supplementary Table S5) between samples with and without an EGR2-E356K mutation with the log₂ expression of IgM-stimulated and unstimulated normal B cells at 90 minutes.

EGR2 Activity Level

EGR2 targets were predicted using the reverse-engineering algorithm ARACNe (adaptive partitioning, 100 bootstraps; *P* < $1e-9$; ref. 46) using CLL expression profiles from GSE22762 (28). EGR2 targets were used to compute the activity of the transcription factor across samples. For this purpose, we first defined activated and repressed targets of EGR2 using the Spearman correlation sign between EGR2 and each target using the GSE22762 dataset. The RNA-seq–CLL gene expression profiles were centered and scaled so as to define a comparable rank of expression of each gene across samples. Then, for each independent sample, we computed the activity level of EGR2 defined as the enrichment score (ES), as defined in GSEA (47), computed with EGR2 targets as the gene set and the ranked list of genes in the sample as the reference set. EGR2 activity will be high when EGR2-activated and EGR2-repressed targets are respectively among the most and the least expressed across samples. This will be reflected as a high ES, here computed as the subtraction of the ES of the activated and the ES of the repressed targets.

Peaks identified from an EGR2 ChIP-seq experiment on human monocytes [Gene Expression Omnibus (GEO) accession GSM785503; ref. 27] were associated with neighbor transcripts (corresponding to 9,651 genes) and were obtained by annotation with the coordinates at $-5/+5$ kb around the transcription start site. Assuming a normal distribution of the peaks (16,558 total peaks), 1,000 tests sampling 224 genes within the 24,910 genes known in hg19 result in a distribution with an average of 80.6 ± 6.85 . A deviation from the average of 12.4 leads to a probability of $P = 9.86 \times 10^{-10}$ to identify 165 genes among the 9,596 genes detected in the ChIP-seq experiment.

Mutational Analyses in 168 CLL Patients

Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells collected at the time of study enrollment using the DNA/RNA Kit (Qiagen) and amplified using the REPLI-G Kit (Qiagen). Genomic regions of *BRAF* (exons 11, 12, and 15), *EGR2* (total coding sequence), *MED12* (exons 1 and 2), *MYD88* (exons 4 and 5), *NFKBIE* (exons 1 and 2), *NOTCH1* (partially exon 34), *SF3B1* (exons 13–16), *TP53* (exons 4–10), and *XPO1* (exons 14 and 15) were amplified using intron-flanking primers tagged with M13 universal primers at the 3' or 5' ends. All abnormalities were validated on nonamplified DNA. The list of used primers can be provided upon request. Statistical analyses comparing patients' baseline characteristics, such as age, gender, Binet stage, blood counts, and cytogenetics analysis, have been performed as previously described (48).

Flow Cytometry and Cell Sorting or Cloning

Peripheral blood samples were stained with FITC anti-CD3, allophycocyanin (APC) anti-CD14, PerCP-Cy5.5 anti-CD5, PE-Cy7 anti-CD19, and phycoerythrin (PE) anti-CD34, all from BD Pharmingen, Inc. For patients with sufficient available material, additional fractions using FITC anti-CD56, PE anti-Ig κ , and APC anti-Ig λ were collected. A representative flow chart of the sorting procedure is shown in Supplementary Fig. S1. CD34⁺ cells were sorted as CD34⁺CD19[−] and were then cloned at 1 cell per well in 96-well plates (Supplementary Fig. S1). Single-cell culture of CD34⁺ clones was performed as described (41) for 10 to 12 days in MEM- α milieu (Life Technologies)

supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; STEMCELL Technologies, Inc.) and recombinant human cytokines: stem cell factor (SCF; 50 ng/mL); FLT3-Ligand (50 ng/mL); pegylated thrombopoietin (TPO; 10 ng/mL); IL3 (10 ng/mL); IL6 (10 ng/mL); granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; 5 ng/mL); erythropoietin (EPO; 1 IU/mL); and G-CSF (10 ng/mL). All cytokines from Peprotech, Inc.

Targeted Resequencing and Mutation Validation

Sorted cell fractions were subjected to DNA/RNA extraction using the AllPrep DNA/RNA Kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. We designed primers flanking exons containing candidate somatic variants using Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Short fragments of 100 to 200 bp were PCR-amplified from genomic DNA of sorted fractions and were subsequently pooled for library construction using the Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Life Technologies). Template preparation was performed with the OneTouch System v37 (Life Technologies). Bar-coded libraries were run on a 1-Gb chip on an Ion PGM Sequencer (Life Technologies). Analysis of acquired data was performed with the Ion Torrent v2.2 software (Life Technologies). Only high-quality reads with a phred score \geq Q20 were included for further analysis. At least 250 reads were obtained per PCR fragment.

Colony Genotyping

DNA from CD34⁺ colonies was prepared as described previously (49). Mutational status and VJ rearrangement were analyzed by Sanger sequencing. The complete list of primers will be provided upon request.

Cellular Methods

The IL3-dependent Ba/F3 cell line (from the American Type Culture Collection) is a kind gift from P. Dubreuil (INSERM U1068, Marseille, France); the SCF-dependent cell line EML is a kind gift from Guy Mouchiroud (CNRS U5534, Lyon, France). Cells were repeatedly tested for their growth factor dependency and checked to be of murine origin by FACS. EML cells were grown in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), 20% horse serum, and 1% penicillin/streptomycin/glutamine, and supplemented with 10% of BHK cells supernatant. BaF3 cells were grown in RPMI medium, 10% bovine serum, and 1% penicillin/streptomycin/glutamine, and supplemented with 10 ng/mL of IL3. Retroviruses were produced and transduction was performed as described previously (50).

Growth Curve

Twelve hours after transduction, cells were washed and seeded at 5×10^6 cells per well. Cells were counted and analyzed by flow cytometry every 2 days. PE-conjugated antibodies were Gr1 (RB-8C5) and B220 (RA3-6B2) from eBioscience and Kit CD117 (2B8) from BD Pharmingen. Experiments were done at least twice in triplicate.

EMSA

The cDNA portion of *EGR2* encoding zinc-finger domain (AA 1-2) was amplified by PCR and cloned into PGEX vector (GE Healthcare Life Sciences). Protein production was induced by IPTG stimulation, and the fusion proteins were purified using Glutathione-Sepharose beads, and eluted from the beads with reduced glutathione following the manufacturer's instructions. SDS-PAGE gel migration followed by Coomassie blue staining and image scanning was used for qualitative and quantitative assessment.

Double-stranded probes were prepared by annealing complementary oligonucleotides harboring one EGR2-consensus binding site. To generate low-affinity and non-binding sites, base changes were

introduced in the core sequence (bold case) of the EGR2 consensus site (underlined) of the strong binding probe 5'-CTCTG TACGCGGGGCGGTTA-3'. Nonspecific competitor was 5'-CTCTG TACGCGCCGCGGTTA-3' (26). The LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Scientific; cat. no. 20148) was used to detect DNA-protein complexes, following the instructions of the manufacturer. Briefly, 2 μ L (~2 μ g) of purified GST-EGR2 protein extracts were incubated with 50 fmol of double-stranded biotinylated probes in Binding Buffer supplemented with 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, and 1 μ g poly dIdC for 10 minutes at room temperature. For competitive assays, a 200 \times excess of double-stranded nonlabeled probes was added to the mixture.

Binding reactions were loaded in 5% nondenaturing polyacrylamide gels and electrophoresed in 0.5 \times TBE buffer at 200 V for 30 minutes. DNA and protein complexes were transferred to HyBond N+ membranes (Amersham) in 0.5 \times TBE buffer at 300 mA for 30 minutes. After UV cross-linking, the membranes were blocked, hybridized with streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) conjugated, and revealed following the manufacturer's instructions. Images were recorded using an ImageQuant detector (GE Healthcare Life Sciences).

Western Blot and Expression Analysis

Two days after transduction, GFP⁺ cells were flow-sorted and the RNA and protein were extracted using the RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit (47700; Norgen Biotek Corp.). Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Anti-EGR2 (P100880; Aviva Systems Biology) and anti-Actin (A3853; Sigma), Phospho-p44/42 MAPK and p44/42 MAPK antibodies (Cell Signaling Technology), and Raf-B (C-19; Santa Cruz Biotechnology) were used as primary antibodies. Secondary HRP-conjugated antibodies [anti-rabbit IgG (NA934V, GE) and anti-mouse IgG (NA931V, GE)], and ECL Plus Kit (RPN2132, GE) were used for detection.

The following TaqMan probes were purchased from Applied Biosystems: Abl1: Mm00802038_g1, Gadd45b Mm00435121_g1, Csf1 Mm00432686_m1, Ccl1 Mm00441236_m1, Gapdh Mm999999_g1, Gusb Mm00446956_m1, Egr1 Mm0065672_m1, Dtx1 Mm00492297_m1, and EGR2 Mm00456650_m1.

Retroviruses

All cDNAs (*EGR2*: NM_001136177; *BRAF*: NM_004333) were subcloned into MSCV-GFP backbone. Mutations were introduced using the Quick Change Kit, following the manufacturer's instructions. Every PCR-amplified or mutagenized fragment was checked by sequencing. Viral particles and transduction procedures were as described previously (50).

Bone marrow transplantation assays and hematopoietic differentiation analyses were performed as described previously (41), except that the mice were analyzed 5 weeks after transplantation. Antibodies used for analyzing B-cell differentiation are anti-mouse CD45.2 V450 (BD Horizon); anti-mouse CD19 APC-eFluor 780, anti-mouse CD43 PE, and anti-mouse IgM PerCP-eFluor 710 (eBioscience); and anti-mouse CD45R/B220 PE-Cy7 and anti-mouse IgD APC (BD Pharmingen).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: F. Damm, Y. Kikushige, K. Akashi, F. Nguyen-Khac, O.A. Bernard

Development of methodology: F. Damm, V. Della Valle, W. Vainchenker, T. Mercher, N. Droin, S. Ogawa

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): F. Damm, E. Mylonas, K. Yoshida,

V. Della Valle, E. Mouly, L. Scourzic, F. Davi, H. Merle-Béral, L. Sutton, W. Vainchenker, N. Droin, S. Ogawa, F. Nguyen-Khac

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): F. Damm, A. Cosson, K. Yoshida, E. Mouly, M. Diop, L. Scourzic, Y. Shiraishi, K. Chiba, H. Tanaka, S. Miyano, J. Lambert, D. Gautheret, P. Dessen, T. Mercher, S. Ogawa, O.A. Bernard

Writing, review, and/or revision of the manuscript: F. Damm, E. Mylonas, Y. Kikushige, P. Dessen, E. Solary, K. Akashi, F. Nguyen-Khac, O.A. Bernard

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): V. Della Valle, H. Merle-Béral, L. Sutton, E. Solary

Study supervision: O.A. Bernard

Acknowledgments

The authors thank the present and past IGR platforms team members for skillful help; Sylvie Chevrete, Julie Lejeune (SBIM, St-Louis, Paris, France), and Claude Lesty (Pitie-Salpetriere Hospital) for help in statistical analyses; F. Norol and H. Trebeden-Negre (Pitie-Salpetriere Hospital) for help with patient material; K. Maloum, D. Roos-Weil, O. Tournilhac, and L. Veronese for patient material and biologic data; and Patrick Charnay and Pascale Gilardi for helpful discussions.

Grant Support

This work was funded by grants from INSERM, Institut National du Cancer (INCa), Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC; équipe labélisée to E. Solary and O.A. Bernard), INCa-DGOS-INSERM (6043), Fondation Gustave Roussy, KAKENHI (23249052 and 22134006), and the Japan Society for the Promotion of Science through the Funding Program for World-Leading Innovative R&D on Science. L. Scourzic is the recipient of a fellowship from the Région Ile de France. F. Damm is the recipient of a Deutsche Krebshilfe fellowship (grant 109686).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

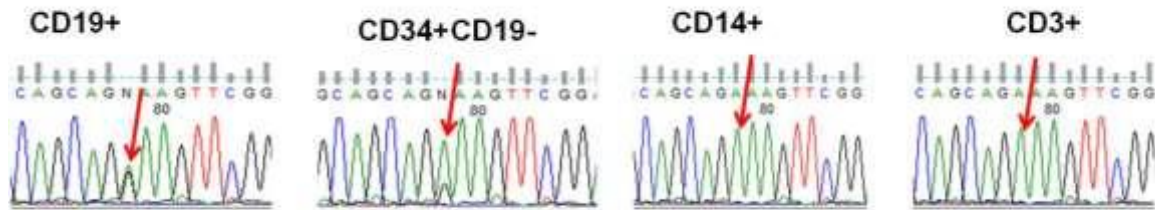
Received January 31, 2014; revised May 20, 2014; accepted June 2, 2014; published OnlineFirst June 11, 2014.

REFERENCES

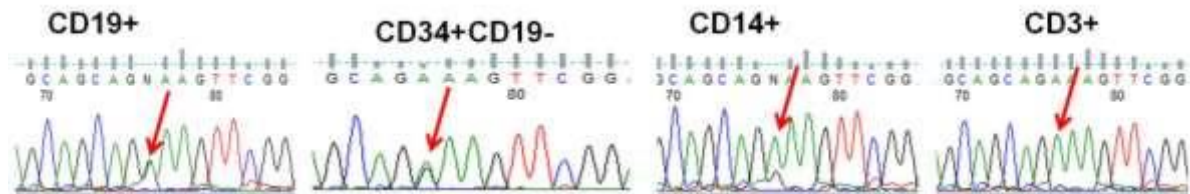
- Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR, Vyas P, Weissman IL, Quake SR, et al. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med* 2012;4:149ra18.
- Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* 2012;150:264–78.
- Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010;10:37–50.
- Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2011;365:2497–506.
- Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordonez GR, Jares P, Bassaganyas L, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2011;44:47–52.
- Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol* 2013;34:592–601.
- Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;117:563–74.
- Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, Wein F, Stilgenbauer S, Durig J, et al. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2012;209:2183–98.
- Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2011;20:246–59.
- Damm F, Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Renneville A, Carbucaia N, Hidalgo-Curtis C, et al. Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;119:3211–8.
- Ebert B, Bernard OA. Mutations in RNA splicing machinery in human cancers. *N Engl J Med* 2011;365:2534–5.
- Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;475:101–5.
- Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, et al. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 2011;364:2305–15.
- Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 2011;476:298–303.
- Rossi D, Trifonov V, Fangazio M, Bruscaggin A, Rasi S, Spina V, et al. The coding genome of splenic marginal zone lymphoma: activation of NOTCH2 and other pathways regulating marginal zone development. *J Exp Med* 2012;209:1537–51.
- Domenech E, Gomez-Lopez G, Gzlez-Pena D, Lopez M, Herreros B, Menezes J, et al. New mutations in chronic lymphocytic leukemia identified by target enrichment and deep sequencing. *PLoS ONE* 2012;7:e38158.
- Sutton L, Chevrete S, Tournilhac O, Divine M, Leblond V, Corront B, et al. Autologous stem cell transplantation as a first-line treatment strategy for chronic lymphocytic leukemia: a multicenter, randomized, controlled trial from the SFGM-TC and GFLC. *Blood* 2011;117:6109–19.
- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004;116:855–67.
- Yasuda T, Sanjo H, Pages G, Kawano Y, Karasuyama H, Pouyssegur J, et al. Erk kinases link pre-B cell receptor signaling to transcriptional events required for early B cell expansion. *Immunity* 2008;28:499–508.
- Chavrier P, Zerial M, Lemaire P, Almendral J, Bravo R, Charnay P. A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G₀/G₁ transition in cultured cells. *EMBO J* 1988;7:29–35.
- Dhomen N, Marais R. New insight into BRAF mutations in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17:31–9.
- Jebaraj BM, Kienle D, Buhler A, Winkler D, Dohner H, Stilgenbauer S, et al. BRAF mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013;54:1177–82.
- Laslo P, Spooner CJ, Warmflash A, Lancki DW, Lee HJ, Sciammas R, et al. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* 2006;126:755–66.
- Li S, Symonds AL, Zhu B, Liu M, Raymond MV, Miao T, et al. Early growth response gene-2 (Egr-2) regulates the development of B and T cells. *PLoS ONE* 2011;6:e18498.
- Zheng Y, Zha Y, Driessens G, Locke F, Gajewski TF. Transcriptional regulator early growth response gene 2 (Egr2) is required for T cell anergy *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med* 2012;209:2157–63.
- Nardelli J, Gibson T, Charnay P. Zinc finger-DNA recognition: analysis of base specificity by site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 1992;20:4137–44.
- Pham TH, Benner C, Lichtinger M, Schwarzfischer L, Hu Y, Andreesen R, et al. Dynamic epigenetic enhancer signatures reveal key transcription factors associated with monocytic differentiation states. *Blood* 2012;119:e161–71.
- Herold T, Jurinovic V, Mulaw M, Seiler T, Dufour A, Schneider S, et al. Expression analysis of genes located in the minimally deleted regions of 13q14 and 11q22–23 in chronic lymphocytic leukemia-unexpected expression pattern of the RHO GTPase activator ARHGAP20. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50:546–58.

29. Vallat LD, Park Y, Li C, Gribben JG. Temporal genetic program following B-cell receptor cross-linking: altered balance between proliferation and death in healthy and malignant B cells. *Blood* 2007;109:3989–97.
30. Vallat L, Kemper CA, Jung N, Maumy-Bertrand M, Bertrand F, Meyer N, et al. Reverse-engineering the genetic circuitry of a cancer cell with predicted intervention in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:459–64.
31. Whiteside ST, Epinat JC, Rice NR, Israel A. I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *EMBO J* 1997;16:1413–26.
32. Memet S, Laouini D, Epinat JC, Whiteside ST, Goudeau B, Philpott D, et al. IkappaBepsilon-deficient mice: reduction of one T cell precursor subspecies and enhanced Ig isotype switching and cytokine synthesis. *J Immunol* 1999;163:5994–6005.
33. Emmerich F, Theurich S, Hummel M, Haeflker A, Vry MS, Dohner K, et al. Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *J Pathol* 2003;201:413–20.
34. Musso M, Balestra P, Taroni F, Bellone E, Mandich P. Different consequences of EGR2 mutants on the transactivation of human Cx32 promoter. *Neurobiol Dis* 2003;12:89–95.
35. Warner LE, Svaren J, Milbrandt J, Lupski JR. Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Hum Mol Genet* 1999;8:1245–51.
36. Brummer T, Shaw PE, Reth M, Misawa Y. Inducible gene deletion reveals different roles for B-Raf and Raf-1 in B-cell antigen receptor signalling. *EMBO J* 2002;21:5611–22.
37. Li S, Miao T, Sebastian M, Bhullar P, Ghaffari E, Liu M, et al. The transcription factors egr2 and egr3 are essential for the control of inflammation and antigen-induced proliferation of B and T cells. *Immunity* 2012;37:685–96.
38. Ferreira PG, Jares P, Rico D, Gomez-Lopez G, Martinez-Trillos A, Villamor N, et al. Transcriptome characterization by RNA sequencing identifies a major molecular and clinical subdivision in chronic lymphocytic leukemia. *Genome Res* 2014;24:212–26.
39. Goardon N, Marchi E, Atzberger A, Quek L, Schuh A, Soneji S, et al. Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2011;19:138–52.
40. Couronne L, Bastard C, Bernard OA. TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2012;366:95–6.
41. Quivoron C, Couronne L, Della Valle V, Lopez CK, Plo I, Wagner-Ballon O, et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2011;20:25–38.
42. Vicente-Duenas C, Fontan L, Gonzalez-Herrero I, Romero-Camarero I, Segura V, Aznar MA, et al. Expression of MALT1 oncogene in hematopoietic stem/progenitor cells recapitulates the pathogenesis of human lymphoma in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:10534–9.
43. Weigert O, Kopp N, Lane AA, Yoda A, Dahlberg SE, Neuberg D, et al. Molecular ontogeny of donor-derived follicular lymphomas occurring after hematopoietic cell transplantation. *Cancer Discov* 2012;2:47–55.
44. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 2011;478:64–9.
45. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 2010;11:R106.
46. Margolin AA, Nemenman I, Basso K, Wiggins C, Stolovitzky G, Dalla Favera R, et al. ARACNE: an algorithm for the reconstruction of gene regulatory networks in a mammalian cellular context. *BMC Bioinformatics* 2006;7(Suppl 1):S7.
47. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:15545–50.
48. Nguyen-Khac F, Lambert J, Chapiro E, Grelier A, Mould S, Barin C, et al. Chromosomal aberrations and their prognostic value in a series of 174 untreated patients with Waldenström's macroglobulinemia. *Haematologica* 2013;98:649–54.
49. Dupont S, Masse A, James C, Teyssandier I, Lecluse Y, Larbret F, et al. The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood* 2007;109:71–7.
50. Malinge S, Ragu C, Della-Valle V, Pisani D, Constantinescu SN, Perez C, et al. Activating mutations in human acute megakaryoblastic leukemia. *Blood* 2008;112:4220–6.

***SF3B1* K700E**



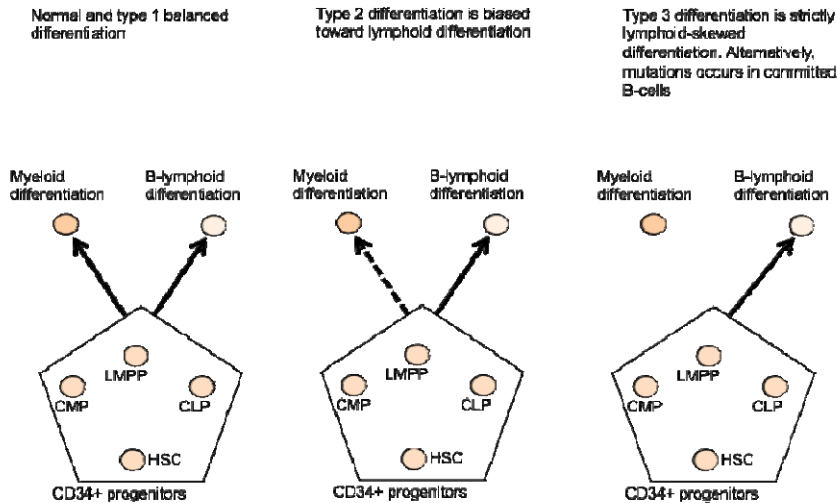
***SF3B1* K700E**



Supplementary Figure S1. Analyses of two patients with detectable *SF3B1* mutations in CD19+, CD34+ and CD14+ fractions. The localization of the mutation is indicated by an arrow. Only the wild type nucleotide (A) is observed in the CD3+ fraction of both patients

Supplementary Figure S3.

S3A: Proposed variations in the balance between myeloid and B-cell lineages in mutated progenitor differentiation. Type 1 and 3 patients are likely to represent the extremes of a continuous between normal and lymphoid-skewed differentiation. lymphoid-primed multipotential progenitor (LMPP), Common myeloid progenitor (CMP), Common lymphoid progenitor (CLP), Hematopoietic stem cells (HSC)



S3B: We analyzed a bone marrow sample from a CLL patient relapsing 10 years after allograft. We identified acquired mutations in CLL cells from limited molecular analyses and sorted progenitor sub-fractions according to Goardon et al, Cancer Cell, 2011. We obtained 2950 hematopoietic stem cells (HSC; CD34+/38-/CD45RA-/CD90+); 4280 multipotential progenitors (MPP; CD34+/38-/CD45RA-/CD90-); 1880 lymphoid-primed multipotential progenitor (LMPP; CD34+/38-/CD45RA+/CD90-); 11670 common myeloid progenitors (CMP; CD34+/CD38+/CD45RA-/CD123+); 55120 granulocyte-macrophage progenitors (GMP; CD34+/CD38+/CD45RA+/CD123+).

In addition to the CD14+ and CD34+ fractions, the SF3B1 mutation was detected in LMPP, and also in colonies from CD34+ single cells. The results are shown below. (the numbers of analyzed reads are in brackets)

These results establish the presence of the SF3B1 mutations in very immature progenitors. The chimeric status of the analyzed sample precludes any accurate quantification of the mutation burden in the current setting.

Mutations	CD3+	CD14+	CD5+C D19+	CD34+CD 19-	HSC	MPP	LMPP	CMP	GMP	CFU
SF3B1 , NM_012433:c.A2098G:p.K700E	1% (3526)	14% (2904)	47% (9402)	25% (2620)	0% (3142)	0% (7659)	14% (1061)	0% (30996)	1% (2368)	5/29 = 18%
TP53 , NM_001126118:c.254_255insA:p.C 85_T86delinsX	0% (7329)	2% (10238)	99% (7720)	7% (8305)	0% (8901)	0% (5524)	4% (6231)	0% (7004)	0% (8284)	0/93
DIS3 , NM_001128226:c.G1372A:p.D458N	0% (4507)	1% (6127)	46% (5296)	2% (5001)	0% (3300)	0% (4917)	0% (2385)	0% (3328)	0% (4026)	ND
ASB12 , NM_130388:c.A901G:p.I301V	1% (12817)	3% (19718)	99% (26674)	11% (22309)	0% (17169)	0% (20143)	0% (16444)	1% (18598)	0% (14469)	0/89

Supplementary Table S1. Biological and clinical features of the 24 patients included in the whole-exome study

IGH								
Patient	Age (years)	Sex	Binet stage	IGHV	Rearrangement*	CD38 ⁺ (%)	ZAP-70 ⁺ (≥20%)	Chromosomal abnormality
CLL01	61	female	B	mutated	2 (IF+OF)	69	positive	del(11)(q22.3)
CLL02	54	male	A	unmutated	2 (IF+IF)	52	N/A	trisomy 12
CLL03	73	male	A	mutated	1	N/A	N/A	trisomy 12
CLL05	55	male	C	unmutated	1	4	positive	del(11)(q22.3) del(13)(q14.3)
CLL06	56	male	B	unmutated	1	37	N/A	none
CLL07	49	male	A	unmutated	1	48	positive	del(13)(q14.3)
CLL08	58	male	B	unmutated	2 (IF+OF)	54	positive	del(13)(q14.3)
CLL09	62	male	C	unmutated	1	57	positive	del(13)(q14.3)
CLL10	88	male	A	unmutated	1	8	N/A	del(11)(q22.3) del(13)(q14.3)
CLL11	54	female	B	mutated	1	N/A	N/A	none
CLL12	53	male	C	unmutated	1	N/A	N/A	del(13)(q14.3)
CLL13	67	male	Richter	unmutated	1	20	N/A	trisomy 12
CLL14	59	male	C	unmutated	1	88	positive	none
CLL15	64	male	B	mutated	1	11	negative	del(13)(q14.3)
CLL16	53	female	B	mutated	2 (IF+OF)	14	positive	none
CLL17	41	female	C	unmutated	1	81	N/A	none
CLL18	42	male	B	unmutated	2 (IF+OF)	29	positive	del(17)(p13.1) del(13)(q14.3)
CLL19	59	male	B	unmutated	1	5	positive	trisomy 12
CLL20	58	male	B	unmutated	1	10	N/A	del(11)(q22.3) del(13)(q14.3)
CLL22	50	male	B	unmutated	1	70	positive	del(11)(q22.3) del(13)(q14.3)
CLL24	39	female	MBL	mutated	1	1	N/A	del(13)(q14.3)
CLL26	70	male	A	mutated	1	3	N/A	none
CLL27	56	female	B	unmutated	1	3	positive	del(11)(q22.3) del(13)(q14.3)
CLL28	42	male	B	unmutated	1	3	positive	none

Supplementary Table S1. Statistics for whole-exome sequencing

Patient	Sample	Number of reads mapped	Depth	Coverage ≥ 2	Coverage ≥ 10
CLL001	normal	145272142	157215169	99,90%	99,30%
	tumor	112203324	10921774	99,80%	98,80%
CLL002	normal	63704324	74559518	99,80%	97,10%
	tumor	90990638	104073647	99,90%	98,50%
CLL003	normal	181957422	188273649	99,90%	99,50%
	tumor	123770970	132767113	99,90%	99,10%
CLL005	normal	120608602	136253129	99,90%	99,20%
	tumor	123130566	139790068	99,90%	99,10%
CLL006	normal	144166920	143683154	99,90%	98,90%
	tumor	127648698	141801475	99,90%	99,20%
CLL007	normal	123469256	12868173	99,80%	98,30%
	tumor	140143226	157597033	99,90%	99,30%
CLL008	normal	175770090	182560381	99,90%	99,00%
	tumor	113881946	131900771	99,90%	99,00%
CLL009	normal	101484598	114724799	99,90%	98,30%
	tumor	153505218	169798313	99,90%	99,40%
CLL010	normal	139677998	108927622	99,40%	94,20%
	tumor	136458064	10639743	99,90%	97,80%
CLL011	normal	109170946	120448004	99,80%	98,20%
	tumor	135110024	144167786	99,90%	99,30%
CLL012	normal	119906092	123687696	99,90%	98,40%
	tumor	162502306	183544312	99,90%	99,50%
CLL013	normal	119435002	135880349	99,70%	97,50%
	tumor	175629404	191187931	99,90%	99,50%
CLL014	normal	120040378	116643462	99,70%	98,20%
	tumor	151174736	125536603	99,80%	99,10%
CLL015	normal	147682982	111436451	99,80%	96,80%
	tumor	140238794	107308871	99,80%	97,60%
CLL016	normal	131846888	96835136	99,60%	95,50%
	tumor	140782416	110859735	99,80%	98,00%
CLL017	normal	109781220	84697665	99,00%	91,90%
	tumor	123286808	102855991	99,70%	96,60%
CLL018	normal	126864522	106459187	99,70%	96,40%
	tumor	109885424	8983338	99,80%	96,60%
CLL019	normal	151425914	9601506	99,80%	96,20%
	tumor	109225548	88315901	99,80%	96,80%
CLL020	normal	152412210	114186892	99,70%	95,60%
	tumor	152129476	113940782	99,90%	98,20%
CLL022	normal	144064296	126763811	99,90%	98,30%
	tumor	143448590	136179091	99,90%	99,30%
CLL024	normal	56967960	4621001	99,30%	91,10%
	tumor	52356294	57250464	99,50%	94,90%
CLL026	normal	40754250	43634427	99,10%	89,40%
	tumor	40408466	43738374	99,40%	91,50%
CLL027	normal	57438156	36492091	99,20%	89,20%
	tumor	56595682	54099623	99,50%	94,50%
CLL028	normal	48774324	46088684	98,70%	85,70%
	tumor	82779422	60931232	99,70%	95,60%

Supplementary Table S1 (suite). Summary of validated somatic mutations identified in CLL patients.

CLL01						
Gene	AA,change	CD3+	CD14+	CD19+	CD34+19@	Colony,frequency
LCMT2	NM_014793:c.C524T:p.A175V	1%	5%	52%	22%	1/56≡1.8%
HECTD1	NM_015382:c.4593_4594del:p.1531_1532del	0%	0%	50%	19%	0/58≡0%
ATM	NM_000051:c.T8175G:p.D2725E	0%	1%	22%	9%	0/58≡0%
BAI3	NM_001704:c.G1843A:p.D615N	0%	2%	20%	8%	0/58≡0%
SF3B1	NM_012433:c.A2098G:p.K700E	1%	2%	51%	7%	0/57≡0%
KIF5A	NM_004984:c.C2314T:p.R772X	0%	2%	40%	6%	
NOG	NM_005450:c.C560G:p.P187R	0%	1%	36%	4%	
KCNJ2	NM_000891:c.C244T:p.R82W	1%	2%	41%	2%	
NBEA	NM_015678:c.G6347A:p.S2116N	0%	2%	40%	2%	
ECE2	NM_001037324:c.G2113A:p.V705M	0%	1%	17%	2%	
PCDHA3	NM_018906:c.G266T:p.R89L	0%	1%	1%	2%	
FGF1	NM_000800:c.T260C:p.L87P	0%	2%	41%	1%	
ITGAV	NM_001145000:c.G1903T:p.A635S	0%	1%	39%	1%	
MAML2	NM_032427:c.G620A:p.R207H	0%	1%	26%	1%	
GCNT2	NM_145649:c.G153C:p.Q51H	0%	1%	21%	1%	
CAMSAP3	NM_020902:c.G1042A:p.G348S	0%	1%	19%	1%	
IQSEC2	NM_001111125:c.T3419C:p.L1140P	0%	1%	15%	1%	
PRPF8	NM_006445:c.G4759C:p.E1587Q	0%	1%	26%	0%	
AIFM3	NM_001018060:c.C947T:p.T316I	0%	1%	20%	0%	
WDR59	NM_030581:c.G1291A:p.V431M	0%	1%	19%	0%	
LIN7A	NM_004664:c.G623A:p.R208H	0%	0%	7%	0%	
ATM	splicing	0%	0%	4%	0%	

CLL02						
Gene	AA,change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19@	Colony,frequency
BRAF	NM_004333:c.G1405A:p.G469R	11%	24%	50%	8%	51/212≡24%
NOTCH1	NM_017617:c.7541_7542del:p.2514_2514del	1%	6%	50%	0%	5/96≡5%
DSP	NM_004415:c.C3659T:p.T1220I	1%	1%	45%	0%	
DMGDH	NM_013391:c.G883A:p.E295K	1%	1%	42%	0%	
FBP1	NM_000507:c.G196A:p.V66M	1%	2%	44%	0%	
WDR85	NM_138778:c.C137T:p.A46V	1%	1%	44%	0%	
IRS4	NM_003604:c.G3272A:p.S1091N	1%	1%	44%	0%	
ODZ1	NM_001163278:c.A3325G:p.T1109A	1%	1%	47%	0%	
SNX8	NM_013321:c.G916A:p.G306S	0%	0%	19%	0%	
ADAD2	NM_001145400:c.C804A:p.C268X	1%	0%	31%	0%	
C11orf57	NM_001082969:c.G250A:p.E84K	1%	1%	24%	0%	
CCDC113	NM_001142302:c.C379T:p.R127W	0%	1%	22%	0%	
KIAA1244	NM_020340:c.G1940C:p.C647S	1%	1%	18%	0%	
PCDHA5	NM_018908:c.T868A:p.S290T	0%	0%	17%	0%	
RAG1	NM_000448:c.G2210A:p.R737H	0%	1%	16%	0%	

CLL03						
Gene	AA,change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19@	Colony,frequency
ZFP92	NM_001136273:c.G827A:p.S276N	1%	2%	100%	0%	
FAM47A	NM_203408:c.A1933C:p.K645Q	2%	2%	98%	0%	0/83≡0%
FLNB	NM_001164317:c.G3734A:p.R1245Q	1%	1%	50%	0%	
EFCAB5	NM_001145053:c.G2189T:p.R730M	1%	1%	49%	0%	
BNIP1	NM_001159642:c.G61A:p.D21N	1%	1%	49%	0%	
WDR19	NM_025132:c.G3316A:p.A1106T	1%	1%	48%	0%	
RASAL1	NM_001193521:c.G1754A:p.R585H	1%	2%	47%	0%	
FSTL5	NM_001128428:c.G1961A:p.G654D	1%	1%	47%	0%	
GALNT7	NM_017423:c.G818A:p.R273Q	1%	1%	45%	0%	
LHFPL4	NM_198560:c.G16A:p.E6K	1%	1%	45%	0%	
AFF3	NM_001025108:c.C2026T:p.R676C	2%	2%	45%	0%	
EIF3G	splicing	0%	0%	42%	0%	
ATP2A1	NM_004320:c.A1940T:p.E647V	1%	1%	42%	0%	
FBLN2	NM_001004019:c.C1070T:p.T357M	1%	1%	38%	0%	
NOTCH1	NM_017617:c.7541_7542del:p.2514_2514del	0%	0%	35%	0%	0/96≡0%
TRAPPC9	NM_031466:c.T94C:p.S32P	0%	1%	12%	0%	

Supplementary Table S1 (suite). Summary of validated somatic mutations identified in CLL patients.

CLL05						
Gene	AA,change	CD3+	CD14+	CD19+	CD34+CD19@	Colony,frequency
FUBP1	NM_003902:c.G1610A:p.W537X	0%	20%	44%	23%	0/91=0%
NFKBIE	NM_004556:c.762_763insA:p.Y254_I255delinsX	0%	17%	47%	19%	2/82=2.4%
SF3B1	NM_012433:c.A2098G:p.K700E	1%	20%	51%	18%	0/93=0%
SACS	NM_014363:c.C9695G:p.T3232R	0%	20%	45%	17%	0/93=0%
LAMA1	NM_005559:c.A7178G:p.Q2393R	0%	23%	43%	16%	
SAMHD1	NM_015474:40453_40485dupTTTCCTCAAAGCAGATC	1%	19%	42%	12%	0/93=0%
HUS1	NM_004507:c.C833T:p.A278V	0%	14%	51%	7%	
ARHGAP33	NM_001172630:c.G1858A:p.A620T	0%	15%	51%	7%	
ZBTB2	NM_020861:c.G921A:p.M307I	0%	22%	46%	7%	
CSNK2B	NM_001320:exon6:c.557+1G>C(splicing)	0%	12%	48%	6%	
LRP8	NM_033300:c.C2248T:p.L750F	0%	16%	47%	6%	
PHGDH;PHGDH	NM_006623:c.G1447A:p.G483S	0%	16%	42%	5%	
CSMD3	NM_052900:c.G2249C:p.S750T	0%	12%	48%	4%	
PIWIL2	NM_001135721:c.G208A:p.G70S	0%	3%	54%	3%	
FER1L5	NM_001113382:c.C5095A:p.P1699T	2%	2%	47%	3%	
RYR2;RYR2	NM_001035:c.C4274T:p.T1425M	0%	4%	34%	2%	
LRMP	NM_001204126:c.C633G:p.D211E	0%	2%	45%	1%	
PLCB4	NM_000933:c.G2354A:p.R785K	0%	0%	9%	1%	
FBXL7	NM_012304:c.G455A:p.R152Q	0%	0%	8%	1%	

CLL06,						
Gene	AA,change	CD3+	CD14+	CD19+	CD34+19@	No#colonies
PLA2G15	NM_012320:c.C83G:p.A28G	4%	14%	57%	45%	
VPS13D	NM_018156:c.A11179G:p.M3727V	2%	7%	50%	45%	
ATP6V0A4	NM_130840:c.C1713A:p.N571K	1%	6%	46%	44%	
ABCA13	NM_152701:c.A11577C:p.Q3859H	2%	6%	46%	41%	
IGSF21	NM_032880:c.C200G:p.T67S	1%	8%	46%	40%	
INHBA	NM_002192:c.C919T:p.R307W	1%	5%	38%	40%	
MCTP2	NM_001159643:c.G626A:p.R209Q	2%	7%	50%	36%	
CRX	NM_000554:c.C44T:p.A15V	1%	6%	43%	32%	
SF3B1	NM_012433:c.A1997C:p.K666T	0%	7%	38%	28%	
XPO1	NM_003400:c.A1712C:p.E571A	1%	8%	41%	26%	
DZIP1L	NM_173543:c.A1298G:p.D433G	1%	3%	47%	25%	
AIM1L	NM_001039775:c.T4621A:p.F1541I	0%	2%	10%	5%	
NDUFV3	NM_021075:c.T511C:p.S171P	1%	1%	10%	5%	
METTL18	NM_033418:c.769_770insA:p.V257fs	0%	3%	12%	4%	

CLL07						
Gene	AA,change	CD3+	CD14+	CD19+	CD34+19@	Colony,frequency
SF3B1	NM_012433:c.A2098G:p.K700E	0%	16%	50%	9%	12/109=11%
XPO1	NM_003400:c.G1711A:p.E571K	1%	17%	50%	2%	1/109=0.9%
GPR158	NM_020752:c.C2428T:p.R810X	1%	6%	53%	3%	0/92=0%
TSR1	NM_018128:c.G1399T:p.A467S	0%	5%	45%	3%	0/92=0%
PCBP4	NM_033008:c.G491A:p.R164H	0%	4%	44%	3%	0/92=0%
GAD1	NM_000817:c.A1433T:p.N478I	2%	6%	45%	2%	0/95=0%
ANKRD17	NM_198889:c.A5818G:p.N1940D	1%	5%	46%	0%	
CAMSAP3	NM_020902:c.T3194C:p.V1065A	0%	5%	47%	0%	
ADAMTS19	NM_133638:c.A1681T:p.M561L	0%	0%	22%	0%	
TTR	NM_000371:c.C391A:p.L131M	0%	0%	8%	0%	

Supplementary Table S1 (suite). Summary of validated somatic mutations identified in CLL patients.

CLL008						
Gene	AA change	CD3+	CD14+	CD19+	CD34+19-	Colony frequency
SF3B1	NM_012433:c.G2225A:p.G742D	1%	14%	48%	7%	0/19 = 0%
ODZ2	NM_001122679:c.G7638T:p.E2546D	2%	16%	48%	8%	0/17 = 0%
MAK	NM_001242385:c.A140G:p.N47S	2%	16%	48%	3%	0/17 = 0%
NRCAM	NM_001037132:c.T1763A:p.L588Q	1%	14%	45%	1%	
ATP6V1B1	NM_001692:c.G1455T:p.M485I	2%	14%	49%	2%	
DSE	NM_001080976:c.C1931T:p.T644I	1%	18%	49%	0%	
BSN	NM_003458:c.G9062A:p.R3021Q	1%	17%	47%	0%	
NFKBIE	NM_004556:c.759_762del:p.253_254del	1%	6%	36%	2%	0/17 = 0%
AEBP1	NM_001129:c.A382T:p.T128S	1%	11%	33%	2%	
OBFC1	NM_024928:c.C814T:p.Q272X	1%	15%	46%	0%	
CPT1B	NM_001145134:c.A688G:p.I230V	1%	2%	27%	2%	
SLC5A4	NM_014227:exon4:c.312+1G>T	0%	3%	27%	2%	
KIF20B	NM_016195:c.A4964T:p.E1655V	0%	0%	18%	0%	
VPS39	NM_015289:c.C1740G:p.F580L	0%	2%	19%	1%	
TTC14	NM_001042601:c.C572G:p.A191G	1%	0%	18%	0%	
CHSY3	NM_175856:c.C2278T:p.P760S	0%	0%	16%	0%	
OR2H2	NM_007160:c.T515G:p.V172G	0%	0%	0%	0%	
NUPL1	NM_001008564:c.A213C:p.K71N	0%	0%	0%	0%	
ZNF714	NM_182515:c.A309T:p.E103D	0%	0%	0%	0%	

CLL09						
Gene	AA change	CD3+	CD14+	CD19+	CD34+19-	Colony frequency
FSIP2	NM_173651:c.G17069C:p.G5690A	1%	10%	51%	31%	0/10 = 0%
PPARGC1A	NM_013261:c.G1889A:p.R630H	2%	2%	48%	26%	
KIAA2026	NM_001017969:c.A1767C:p.L589F	2%	4%	52%	25%	0/16 = 0%
LUZP2	NM_001252010:c.G612T:p.K204N	2%	3%	51%	24%	0/15 = 0%
LCMT2	NM_014793:c.G1156A:p.V386M	1%	3%	51%	24%	
SF3B1	NM_012433:c.A2098G:p.K700E	2%	4%	51%	24%	1/14 = 7.1%
SYNJ1	NM_001160302:c.G200A:p.R67Q	1%	2%	47%	24%	
SCN7A	NM_002976:c.T1232C:p.I411T	1%	2%	49%	23%	0/21 = 0%
KRTAP25-1	NM_001128598:c.A166C:p.I56L	1%	2%	48%	22%	
TRIM71	NM_001039111:c.T865A:p.Y289N	1%	2%	48%	15%	
CNOT3	NM_014516:c.G530A:p.R177H	1%	3%	45%	15%	
DPM3	NM_018973:c.T50G:p.L17R	0%	2%	44%	15%	
PCSK5	NM_001190482:c.G728A:p.R243Q	1%	4%	43%	15%	
PID1	NM_001100818:c.G391T:p.A131S	1%	2%	30%	15%	
AGA	NM_000027:c.C23T:p.P8L	1%	1%	49%	12%	
ALG11	NM_001004127:c.C662G:p.A221G	2%	2%	56%	9%	
RBP3	NM_002900:c.G712A:p.V238M	0%	1%	22%	9%	
CES1	NM_001025194:c.C1159A:p.P387T	1%	1%	35%	8%	
TNXB	NM_019105:c.C1516T:p.R506C	2%	3%	21%	7%	
CREBBP	NM_001079846:c.3620_3621insC:p.Q1207fs	0%	3%	46%	6%	
CAMTA1	NM_015215:c.G940A:p.E314K	1%	1%	19%	6%	
SRF	NM_003131:c.C1187G:p.T396R	0%	1%	19%	5%	
CHTOP	NM_001206612:c.A457G:p.R153G	1%	1%	20%	4%	
MUC16	NM_024690:c.C39391T:p.R13131W	0%	1%	26%	3%	
NEFH	NM_021076:c.A1435G:p.K479E	1%	1%	22%	3%	
ABCA13	NM_152701:c.G9064T:p.G3022C	0%	1%	14%	3%	
RPRM	NM_019845:c.G79A:p.V27M	1%	1%	27%	2%	
ACTN2	NM_001103:c.C1298T:p.S433L	0%	0%	11%	2%	
XPO1	NM_003400:c.G1711A:p.E571K	0%	1%	8%	2%	
SLU7	NM_006425:c.1154delC:p.P385fs	1%	1%	6%	1%	
GOLGB1	NM_001256488:c.C6347T:p.T2116I	0%	0%	7%	0%	

Supplementary Table S1 (suite). Summary of validated somatic mutations identified in CLL patients.

CLL10						
Gene	AA change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19-	No colonies
NOTCH1	NM_017617:c.C7538A:p.S2513Y	1%	1%	52%	40%	
TMEM184B	NM_001195071:c.298_300del:p.100_100del	0%	0%	46%	20%	
CTBP2	NM_022802:c.A647G:p.E216G	5%	0%	45%	17%	
YEATS2	NM_018023:exon2:c.100+1G>T	2%	0%	62%	15%	
CYP26A1	NM_000783:c.C1432T:p.P478S	2%	0%	48%	7%	
DNAH6	NM_001370:c.C5530T:p.L1844F	1%	1%	48%	5%	
RAPH1	NM_213589:c.3239_3240del:p.1080_1080del	0%	0%	42%	2%	
MGA	NM_001164273:exon20:c.7192-2A>G	1%	1%	51%	1%	
CGNL1	NM_032866:c.C1027T:p.R343W	1%	2%	52%	0%	
BEGAIN	NM_001159531:c.G716A:p.R239Q	1%	1%	51%	0%	
TP53	NM_001126115:c.G191C:p.R64P	2%	1%	50%	0%	
PATE1	NM_138294:c.G318A:p.W106X	2%	1%	50%	0%	
NDRG2	NM_201536:c.G173A:p.G58E	1%	1%	50%	0%	
HIPK4	NM_144685:c.C768A:p.D256E	1%	1%	50%	0%	
STK10	NM_005990:c.G157C:p.A53P	1%	1%	48%	0%	
ARFGEF2	NM_006420:c.A2414G:p.N805S	0%	2%	46%	0%	
DSCAM	NM_001389:c.1646_1648del:p.549_550del	0%	1%	45%	0%	
NIPBL	NM_015384:c.991delT:p.L331X	0%	0%	44%	0%	
GPR75	NM_006794:c.C696G:p.N232K	0%	1%	44%	0%	
WDFY3	NM_014991:c.T74G:p.L25R	0%	0%	38%	0%	

CLL11						
Gene	AA change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19-	Colony frequency
XPO1	NM_003400:c.G1711A:p.E571K	2%	2%	48%	4%	1/130 = 0.9%
ZMYM3	NM_001171162:c.A3653C:p.Q1218P	2%	0%	99%	0%	
FAT2	NM_001447:c.C6142T:p.P2048S	1%	0%	50%	0%	
AKAP6	NM_004274:c.A6233T:p.E2078V	1%	1%	47%	0%	
ODZ4	NM_001098816:c.C647T:p.T216M	1%	0%	41%	0%	
XPO5	NM_020750:c.G131A:p.C44Y	1%	0%	41%	0%	
RASSF10	NM_001080521:c.G667A:p.E223K	1%	0%	40%	0%	
SBSN	NM_001166034:c.C1453A:p.H485N	1%	0%	39%	0%	
AGMO	NM_001004320:c.G79T:p.E27X	1%	0%	37%	0%	
NOTCH1	NM_017617:c.C7459T:p.Q2487X	1%	0%	37%	0%	0/87 = 0%
SLC5A7	NM_021815:c.C1144T:p.R382X	1%	0%	34%	0%	
SCN3A	NM_001081676:c.C86T:p.A29V	0%	0%	33%	0%	
SCN3A	NM_001081676:c.C62T:p.S21F	0%	0%	32%	0%	
MGA	NM_001080541:c.2061_2062del:p.687_688del	0%	0%	32%	0%	
NOTCH1	NM_017617:c.7541_7542del:p.2514_2514del	0%	0%	24%	0%	0 / 87 = 0%
NFKBIE	NM_004556:c.759_762del:p.253_254del	0%	0%	17%	0%	
FOXG1	NM_005249:c.G765A:p.W255X	0%	0%	16%	0%	
IKBKB	NM_001190720:c.A506T:p.K169M	0%	0%	4%	0%	
NAV3	NM_014903:c.C4987T:p.R1663C	0%	0%	4%	0%	

CLL12						
Gene	AA change	CD3+	CD14+	CD19+	CD34+19-	Colony frequency
EGR2	NM_000399:c.C1150A:p.H384N	2%	41%	50%	34%	13/47 = 27.7%
SPDYE4	NM_001128076:c.G284A:p.R95Q	2%	4%	50%	3%	
FAM49A	NM_030797:c.C490T:p.R164C	3%	1%	50%	1%	
UBP1	NM_001128160:c.C95T:p.A32V	3%	4%	47%	1%	
NTN1	NM_004822:c.G998A:p.R333H	1%	0%	43%	1%	
SORL1	NM_003105:c.C2362T:p.R788W	1%	0%	41%	1%	
SF3B1	NM_012433:c.A2098G:p.K700E	2%	0%	40%	1%	0/128 = 0%
DDX3X	NM_001356:exon2:c.103+1G>T	3%	4%	99%	0%	
KRAS	NM_004985:c.G40T:p.V14L	1%	0%	19%	0%	
PRKCH	NM_006255:c.C977T:p.S326L	1%	0%	19%	0%	
SHROOM4	NM_020717:c.G2497A:p.A833T	0%	0%	15%	0%	
ABCB11	NM_003742:c.G1441A:p.V481M	0%	0%	11%	0%	
POU6F2	NM_001166018:c.G1384A:p.V462M	1%	0%	11%	0%	
SLC5A10	NM_001042450:c.C24G:p.D8E	0%	0%	9%	0%	
CPB1	NM_001871:c.G596A:p.R199H	0%	0%	9%	0%	
KIAA0895	NM_001199706:exon4:c.715-1G>T	0%	0%	8%	0%	

Supplementary Table S1 (suite). Summary of validated somatic mutations identified in CLL patients.

CLL13						
Gene	AA,change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19@	Colony,frequency
NIPAL4	NM_001172292:c.C498A:p.Y166X	0%	0%	49%	7%	0/81=0%
MLL2	NM_003482:c.9265delG:p.V3089fs	8%	15%	50%	6%	4/93=4%
BRAF	NM_004333:c.G1397T:p.G466V	0%	0%	47%	1%	0/89=0%
DNAH3	NM_017539:c.C6901T:p.R2301W	0%	1%	42%	1%	
TP53	NM_001126115:c.C190T:p.R64XlbzwIR196X	0%	0%	21%	0%	
TP53	NM_001126115:c.G335C:p.G112Albzw.IG244A	0%	1%	60%	0%	
LRP1	NM_002332:c.C11389A:p.R3797S	0%	2%	51%	0%	
UPF2	NM_015542:c.C724G:p.Q242E	0%	0%	50%	0%	
TNR	NM_003285:c.G2273A:p.R758K	0%	0%	50%	0%	
LRRC7	NM_020794:c.G3467T:p.S1156I	0%	0%	44%	0%	
SNCAIP	NM_001242935:c.C34T:p.R12X	1%	0%	48%	0%	
MAP1A	NM_002373:c.T2783C:p.I928T	0%	0%	48%	0%	
SF3B1	NM_012433:c.T2111A:p.I704N	0%	0%	47%	0%	
SPEN	NM_015001:c.C3743A:p.S1248X	0%	0%	46%	0%	
C15orf54	NM_207445:c.C283A:p.Q95K	0%	0%	45%	0%	
SPEN	NM_015001:c.C2014T:p.R672X	0%	0%	45%	0%	
KRT39	NM_213656:c.C1137A:p.Y379X	0%	0%	45%	0%	
MYO1B	NM_001130158:c.S57_558insT:p.S186fs	0%	2%	41%	0%	
IRS1	NM_005544:c.C328G:p.L110V	0%	0%	38%	0%	
PDPR	NM_017990:c.A1556T:p.E519V	0%	0%	38%	0%	
RIMKLB	NM_020734:c.A709T:p.M237L	0%	0%	36%	0%	
RPS6KA4	NM_001006944:c.G1655A:p.R552Q	0%	0%	18%	0%	
DHRS4L1	NM_001082488:c.T55A:p.L19M	0%	0%	3%	0%	
ARHGAP23	NM_001199417:c.G1919A:p.R640H	0%	0%	1%	0%	

CLL14						
Gene	AA,change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19@	No#colonies
XPO1	NM_003400:c.G1711A:p.E571K	1%	13%	45%	2%	
BRCA2	NM_000059:c.1446_1447insG:p.L482fs	0%	6%	45%	0%	
ALDH7A1	NM_001202404:c.G1414A:p.G472S	0%	0%	24%	0%	
ZNF683	NM_001114759:c.G424A:p.G142S	0%	0%	21%	0%	
BMP10	NM_014482:c.A970G:p.K324E	0%	0%	20%	0%	
CANT1	NM_138793:c.C589G:p.P197A	0%	0%	20%	0%	
NF1	NM_001128147:exon7:c.730+2T>G	0%	0%	19%	0%	
REEP3	NM_001001330:c.C527T:p.A176V	0%	0%	18%	0%	
RBM46	NM_144979:c.C952T:p.H318Y	0%	0%	13%	0%	

CLL15						
Gene	AA,change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19@	No#colonies
MYD88	NM_001172566:c.T478C:p.X160R	1%	0%	50%	2%	
RBPJL	NM_014276:c.C791T:p.P264L	1%	0%	48%	2%	
TET1	NM_030625:c.C314T:p.A105V	0%	0%	44%	1%	
C2orf81	NM_001145054:c.G289A:p.E97K	1%	0%	49%	0%	
ELP3	NM_018091:c.A110T:p.D37V	0%	1%	48%	0%	
SLC5A12	NM_178498:c.G785T:p.R262L	1%	1%	47%	0%	
ETS2	NM_005239:c.C148A:p.Q50K	1%	0%	44%	0%	
SLITRK3	NM_014926:c.A305T:p.N102I	1%	0%	41%	0%	
SLITRK3	NM_014926:c.T317C:p.I106T	1%	0%	41%	0%	
APC2	NM_005883:c.G2803C:p.G935R	0%	0%	37%	0%	
UNC119B	NM_001080533:c.C523T:p.R175W	0%	0%	29%	0%	
LAMA1	NM_005559:c.T2155C:p.S719P	0%	0%	24%	0%	
KCNQ3	NM_001204824:c.C2071A:p.Q691K	0%	0%	6%	0%	

Supplementary Table S1 (suite). Summary of validated somatic mutations identified in CLL patients.

CLL16						
Gene	AA change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19-	Colony frequency
GRIA4	NM_000829:c.G1638T;p.E546D	0%	0%	51%	4%	0/95 = 0%
NIPAL4	NM_001172292:c.T986G;p.L329R	0%	0%	45%	0%	
NIPAL4	NM_001172292:c.T1019G;p.I340S	0%	0%	44%	0%	
IKZF3	NM_012481:c.T485G;p.L162R	0%	1%	45%	0%	
SHISA2	NM_001007538:c.C439T;p.Q147X	0%	1%	45%	0%	
SF3B1	NM_012433:c.G1866T;p.E622D	0%	0%	44%	1%	0/106 = 0%
NIPAL4	NM_001172292:c.T1019G;p.I340S	0%	0%	44%	0%	
PHKA2	NM_000292:c.G1664T;p.R555M	1%	1%	44%	0%	
GLIS3	NM_152629:c.T28A;p.S10T	0%	1%	42%	0%	
TRAPPC9	NM_001160372:c.G832A;p.A278T	0%	0%	39%	0%	
NDST3	NM_004784:c.T323C;p.I108T	1%	0%	38%	1%	
SENP5	NM_152699:c.A1313G;p.N438S	0%	0%	37%	0%	
ZEB2	NM_001171653:c.T2383C;p.S795P	0%	0%	35%	0%	
SEC31A	NM_016211:c.T1682A;p.I561K	0%	0%	35%	0%	
HEATR8	NM_001039464:c.C2437T;p.R813X	0%	0%	34%	0%	
PLXNB3	NM_005393:c.C5105T;p.T1702M	0%	0%	24%	0%	
PKHD1	NM_138694:c.C11737T;p.R3913C	0%	0%	22%	1%	
C14orf180	splicing	0%	0%	10%	0%	
PEG10	NM_001172438:c.168_170del;p.S6_57del	0%	0%	9%	0%	
DACH2	NM_001139514:c.A1258G;p.T420A	0%	0%	2%	0%	

CLL17						
Gene	AA change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19-	Colony frequency
FUBP1	NM_003902:c.G310T;p.E104X	0%	0%	50%	21%	0/93 = 0%
ISM1	NM_080826:c.C1001T;p.T334M	0%	1%	45%	18%	1/94 = 1%
NOTCH1	NM_017617:c.7541_7542del;p.2514_2514del	0%	2%	45%	9%	10/94 = 10.6%
GMPS	NM_003875:c.T2025G;p.I675M	0%	1%	41%	8%	0/88 = 0%
DDR2	NM_006182:c.G205T;p.D69Y	1%	1%	52%	0%	
DPPA4	NM_018189:c.C620T;p.A207V	1%	1%	50%	0%	
FGF18	NM_003862:c.G473A;p.R158Q	1%	2%	47%	0%	
RPS23	NM_001025:c.C113T;p.A38V	1%	0%	39%	0%	
DYNC1H1	NM_001376:c.C8561T;p.A2854V	1%	1%	36%	0%	
TACC2	NM_206862:c.C4811A;p.S1604Y	1%	0%	36%	0%	
TLR3	NM_003265:c.T1562C;p.I521T	0%	1%	21%	0%	
IRF4	NM_001195286:c.C342G;p.S114R	0%	1%	18%	0%	
KLRC4-KLRK1	NM_007360:c.G148T;p.A50S	0%	0%	17%	0%	
KLRC4-KLRK1	NM_001199805:exon9:c.148+1G>T	0%	0%	17%	0%	
CYP24A1	NM_000782:c.C1315T;p.R439C	0%	0%	17%	0%	
MDN1	NM_014611:c.G7606A;p.V2536I	0%	0%	16%	0%	
DLG2	NM_001142702:c.A170G;p.D57G	0%	0%	15%	0%	
FAM129A	NM_052966:c.C2612T;p.A871V	0%	0%	13%	0%	
JPH2	NM_020433:c.C922T;p.R308C	0%	0%	9%	0%	
FSCB	NM_032135:c.C365A;p.P122H	0%	0%	8%	0%	
SLITRK2	NM_001144009:c.C2192A;p.A731D	0%	0%	8%	0%	
GAB1	NM_002039:c.1230delA;p.R410fs	0%	0%	7%	0%	

CLL18						
Gene	AA change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19-	Colony frequency
NOTCH1	NM_017617:c.7541_7542del;p.2514_2514del	0%	0%	48%	4%	7/93 = 7.5%
ELK4	NM_001973:c.C1115T;p.S372F	1%	2%	46%	0%	
ZNF93	NM_031218:c.T406C;p.C136R	0%	1%	52%	0%	
ATP5J2-PTCD1	NM_015545:c.C1211T;p.A404V	1%	2%	52%	0%	
PTPN14	NM_005401:c.C2901A;p.H967Q	1%	1%	47%	0%	
PABPC4L	NM_001114734:c.A614G;p.Q205R	0%	1%	43%	0%	
TOP2B	NM_001068:c.C4457G;p.T1486R	1%	2%	42%	0%	
CACNA1E	NM_001205294:c.G4679A;p.R1560Q	0%	1%	40%	0%	
GPR158	NM_020752:c.T429A;p.N143K	0%	0%	36%	0%	
MCOLN2	NM_153259:c.A1393G;p.M465V	1%	1%	33%	0%	
KIAA1704	NM_018559:c.603_604insT;p.D201fs	0%	3%	32%	0%	
TP53	NM_001126115:c.A94G;p.K32E	0%	0%	12%	0%	

Supplementary Table S1 (suite). Summary of validated somatic mutations identified in CLL patients.

CLL19						
Gene	AA,change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19@	Colony,frequency
SMARCA1	NM_139035:c.C2847G;p.N949K	2%	3%	99%	5%	0/55=0%
HEPH	NM_138737:c.C67T;p.H23Y	0%	4%	83%	8%	0/57=0%
RPRD2	NM_015203:c.A3607T;p.T1203S	0%	2%	53%	0%	
ZFP36L1	NM_001244698:c.C474G;p.C158W	1%	3%	52%	3%	
DOCK1	NM_001380:c.C2636T;p.A879V	0%	1%	52%	8%	0/39=0%
SF3B1	NM_012433:c.A2110T;p.I704F	0%	2%	52%	3%	
OR8G2	NM_001007249:c.C413T;p.A138V	0%	2%	50%	4%	
MADD	NM_001135943:c.T1727C;p.I576T	0%	2%	50%	4%	0/55=0%
FGF3	NM_005247:c.C419T;p.T140M	0%	2%	44%	0%	
SIPA1L2	NM_020808:c.G2623A;p.G875R	0%	0%	41%	2%	
GBE1	NM_000158:c.G406T;p.V136L	0%	1%	37%	2%	
RPS25	NM_001028:c.G223A;p.E75K	0%	1%	18%	1%	
MAP3K14	UNKNOWN	0%	1%	16%	1%	
MUC6	NM_005961:c.G4918A;p.A1640T	0%	1%	16%	1%	
NCBP2	NM_001042540:c.G245A;p.R82Q	0%	0%	15%	0%	
CEP97	NM_024548:c.G290A;p.G97E	0%	1%	12%	0%	
OR2W3	NM_001001957:c.G118A;p.V40I	0%	0%	8%	0%	
OIT3	NM_152635:c.G1292T;p.S431I	0%	0%	8%	0%	
WNT9A	NM_003395:c.G489T;p.W163C	0%	0%	6%	0%	
TAS2R43	NM_176884:c.A359G;p.H120R	0%	0%	3%	0%	

CLL20						
Gene	AA,change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19@	Colony,frequency
MED12	NM_005120:c.G97A;p.E33K	1%	12%	92%	7%	7/39=17.9%
MCF2L	NM_001112732:c.G1322A;p.C441Y	8%	8%	53%	7%	0/32=0%
TP53	R248Q	0%	4%	41%	6%	0/32=0%
ATM	NM_000051:c.C2941T;p.R981C	1%	2%	61%	5%	
OR51F2	NM_001004753:c.T136G;p.C46G	1%	0%	53%	2%	
FERMT1	NM_017671:c.G1783C;p.A595P	1%	0%	50%	1%	
MAMLD1	NM_001177466:c.G1802A;p.R601Q	2%	3%	92%	0%	
USP19	NM_001199160:c.G101A;p.S34N	1%	0%	39%	0%	
C7orf10	NM_001193311:c.A635G;p.D212G	0%	1%	52%	0%	
PODXL	NM_001018111:c.G388C;p.D130H	0%	0%	9%	0%	
WDR25	NM_001161476:c.A1363G;p.T455A	0%	0%	40%	0%	
ADAMTS17	NM_139057:c.C2840T;p.A947V	0%	0%	53%	0%	
TRMT61A	NM_152307:c.A272T;p.D91V	1%	0%	46%	0%	
CXCR2	NM_001557:c.G431A;p.R144H	1%	0%	59%	0%	
STRN3	NM_014574:c.T1314A;p.D438E	0%	0%	51%	0%	
HHLA1	NM_001145095:c.G1243C;p.D415H	0%	0%	48%	0%	
MYBL2	NM_002466:c.C1652T;p.S551F	1%	0%	52%	0%	
LAMC3	NM_006059:c.C1978T;p.R660W	0%	0%	37%	0%	
EML4	NM_001145076:c.G152A;p.R51H	0%	0%	37%	0%	
TMEM119	NM_181724:c.C614T;p.A205V	0%	0%	39%	0%	
PHF3	NM_015153:c.G5018A;p.C1673Y	0%	0%	9%	0%	
CXorf23	NM_198279:c.1167delA;p.Q389fs	0%	0%	17%	0%	
LRRC27	NM_001143757:c.C1579T;p.R527C	0%	0%	15%	0%	
SCO1	NM_004589:c.A842C;p.K281T	0%	0%	11%	0%	
COPS2	NM_001143887:c.A867C;p.L289F	0%	0%	9%	0%	
SDR42E1	NM_145168:c.C445T;p.P149S	0%	0%	8%	0%	
NCAPH	NM_015341:c.807delC;p.D269fs	0%	0%	8%	0%	
SETD2	NM_014159:c.1263delG;p.R421fs	0%	0%	7%	0%	
LOC100329135	NM_001195576:c.T58G;p.L20V	0%	0%	12%	0%	
TSPAN15	NM_012339:c.C7G;p.R3G	0%	0%	4%	0%	
ZNF595,ZNF718	NM_001039127:c.C61A;p.L21M	0%	0%	9%	0%	
CAMTA1	NM_015215:c.G3973A;p.D1325N	0%	0%	3%	0%	
PKD1L1	NM_138295:c.G925T;p.G309X	0%	0%	5%	0%	

Supplementary Table S1 (suite). Summary of validated somatic mutations identified in CLL patients.

CLL22						
Gene	AA change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19-	Colony frequency
SEMG1	NM_003007:c.C292T;p.R98X	2%	1%	48%	10%	0/31 = 0%
EGR2	NM_000399:c.G1066A;p.E356K	1%	2%	49%	8%	1/31 = 3.2%
YWHAB	NM_139323:c.A4G;p.T2A	1%	1%	44%	7%	
C3	NM_000064:c.C1073A;p.T358N	2%	1%	47%	5%	
NCR3	NM_001145467:c.A518G;p.H173R	1%	1%	48%	1%	
ATM	NM_000051:c.C2290delA;p.K764fs	0%	0%	60%	0%	
PMEL	NM_001200053:c.G1063T;p.A355S	2%	1%	53%	0%	
SPAG17	NM_206996:c.G5655T;p.K1885N	1%	1%	49%	0%	
BUB1	NM_004336:c.G1922T;p.C641F	1%	0%	47%	0%	
ELFN2	NM_052906:c.A1705T;p.S569C	1%	0%	47%	0%	
TJP1	NM_003257:c.C2627A;p.R876Q	1%	1%	39%	0%	
ATM	NM_000051:c.T3661A;p.W1221R	0%	0%	29%	0%	
GABRA2	NM_001114175:c.C176T;p.P59L	0%	0%	8%	0%	
TTN	NM_003319:c.A20338T;p.S6780C	0%	0%	7%	0%	

CLL24						
Gene	AA change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19-	No colonies
LCA5	NM_001122769:c.A1950C;p.E650D	0%	0%	49%	0%	
ABCA4	NM_000350:c.C6445T;p.R2149X	2%	1%	47%	0%	
TBCEL	NM_001130047:c.C889T;p.R297X	0%	0%	47%	0%	
FBXO25	NM_012173:c.G265A;p.V89I	0%	0%	46%	0%	
HIST1H2BK	NM_080593:c.A128C;p.Y43S	0%	0%	25%	0%	
G6PD	NM_000402:c.G582A;p.W194X	0%	0%	15%	0%	

CLL26						
Gene	AA change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19-	Colony frequency
ACTN2	WDR60:NM_018051:exon23:c.A2732C;p.K911T,	1%	4%	49%	11%	0/68 = 0%
C15orf2	ACTN2:NM_001103:exon1:c.A58G;p.M20V,	0%	4%	49%	9%	0/72 = 0%
STARD9	C3orf38:NM_173824:exon2:c.T149G;p.I50R,	0%	0%	48%	0%	
C3orf38	BHLHE22:NM_152414:exon1:c.A875T;p.Y292F,	0%	0%	47%	0%	
EPHA5	UGT2B15:NM_001076:exon6:c.G1457A;p.W486V,	0%	0%	31%	0%	
UGT2B15	STARD9:NM_020759:exon22:c.C2477T;p.T826M	0%	2%	30%	0%	
SPINK7	SPINK7:NM_032566:exon4:c.A228T;p.R76S,	0%	0%	30%	0%	
WDR60	EPHA5:NM_004439:exon5:c.G1157A;p.R386K	0%	0%	27%	0%	
PCLO	PCLO:NM_033026:exon5:c.G6751C;p.A2251P	0%	2%	25%	0%	
BHLHE22	C15orf2:NM_018958:exon1:c.C2516T;p.T839I,	0%	0%	15%	0%	

CLL27						
Gene	AA change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19-	Colony frequency
MTOR	NM_004958:exon13:c.1787-1G>T	0%	7%	49%	2%	0/96 = 0%
XPO1	NM_003400:c.G1711A;p.E571K	0%	12%	49%	1%	1/75 = 1.3%
NFE2L1	NM_003204:c.G295A;p.E99K	0%	12%	48%	1%	0/93 = 0%
MYO9A	NM_006901:c.G3382A;p.A1128T	0%	4%	48%	1%	
MUC2	NM_002457:c.T8416C;p.S2806P	0%	0%	44%	1%	
KBTBD5	NM_152393:c.G448A;p.V150M	0%	3%	46%	0%	
BIRC6	NM_016252:c.7441_7444del;p.2481_2482del	0%	4%	41%	0%	
ATM	NM_000051:c.C7468T;p.L2490F	0%	0%	78%	1%	
OR51F2	NM_001004753:c.G958A;p.V320I	1%	0%	21%	0%	
NFKBIE	NM_004556:c.759_762del;p.253_254del	0%	0%	9%	0%	

Supplementary Table S1 (suite). Summary of validated somatic mutations identified in CLL patients.

CLL28,						
Gene	AA,change	CD3+	CD14+	CD5+/CD19+	CD34+19@	No#colonies
PEG3	NM_001146186:c.C1307T;p.S436F	6%	4%	50%	4%	
PIK3C2B	NM_002646:c.A1667G;p.N556S	1%	0%	47%	4%	
ATM	NM_000051:c.C8576T;p.S2859F	1%	0%	92%	0%	
ALG12	NM_024105:c.C1313T;p.P438L	1%	1%	48%	0%	
LAMB3	NM_001017402:c.C430T;p.R144X	1%	0%	47%	0%	
INO80D	NM_017759:c.C214T;p.R72C	1%	0%	47%	0%	
HMCN1	NM_031935:c.G11378A;p.R3793H	1%	0%	46%	0%	
CYP2C9	NM_000771:c.G60A;p.W20X	1%	0%	46%	0%	
SLC35F3	NM_173508:c.C332T;p.P111L	1%	0%	46%	0%	
EOMES	NM_005442:c.1400delG;p.G467fs	0%	0%	46%	0%	
PAPPA2	NM_020318:c.C2464A;p.Q822K	1%	0%	45%	0%	
GLTSCR1	NM_015711:c.3919delG;p.G1307fs	0%	0%	43%	0%	
SF3B1	NM_012433:c.A2098G;p.K700E	1%	0%	43%	0%	
ANKS1B	NM_152788:c.G2389A;p.E797K	0%	0%	31%	0%	

Supplementary Table S1 (suite),

Evaluation of clonal heterogeneity

We define two groups :

Group 3 : CLL03, CLL15 and CLL24

Group 2 all the other patients : CLL01, CLL02, CLL05 to CLL14, CLL16 to CLL20, CLL22, CLL26 to CLL28

For each sample, the variances of the mutation proportions and the number of mutations are calculated. Then a Student t test is done to compare the means of the variances and the means of the number of mutations between the two groups.

Variances of the mutation proportions

Group 1	Variance	Group 2	Variance	Group 2	Variance	Group2	Variance
CLL03	456	CLL01	229	CLL10	23	CLL18	123
CLL02	179	CLL11	416	CLL19	705		
CLL15	160	CLL05	160	CLL12	605	CLL20	618
CLL06	246	CLL13	218	CLL22	249		
CLL024	208	CLL07	206	CLL14	121	CLL26	148
CLL08	171	CLL16	191	CLL27	333		
CLL09	265	CLL17	264	CLL28	177		
Mean1	275	Mean2	269				

Result of the t test : p-value = 0.9582, at a alpha risk of 5 % the means of the variances are equal.

Number of mutations

Group 1	Variance	Group 2	Variance	Group 2	Variance
CLL03	16	CLL01	22	CLL10	20
CLL02	15	CLL11	19	CLL19	20
		CLL05	19	CLL12	16
				CLL20	33

Supplementary Table S2. Early mutations affect genes mutated in various human cancers (addition to the main text).

Gene	Mutation in malignant homeopathies	Example of cancer showing gene mutations
LCMT2	CLL	
FAM47A	CLL	
FUBP1	CLL	Large intestine
SACS	myeloma	
PLAG15		
ODZ2	CLL	
FSIP2		Oesophagus Adenocarcinoma
MED12	CLL,ALL	
KIAA2026		Breast
GRIA4		Large intestine
ISM1		Large intestine
SMARCA1	DLBCL	
HEPH	myeloma	
MCF2L		Large intestine
SEMG1		Lung
LCA5	MDS & non-Hodgkin lymphoma	
ABCA4	CLL & Natural Killer/T-cell Lymphoma	
WDR60		Large intestine
TBCEL		Large intestine
ACTN2		Lung
NFE2L1		Large intestine
MTOR	CLL	
PEG3	CLL & splenic marginal zone lymphoma	
PIK3C2B		Large intestine

Data from Cosmic (www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/)

Supplementary Table S3. Biological and clinical features of the 168 CLL patients according to *EGR2*, *NFKB1E* and *BRAF* mutations

	<i>EGR2</i> - wildtype n=154	<i>EGR2</i> - mutated n=14	<i>P</i>	<i>NFKB1E</i> - wildtype n =150	<i>NFKB1E</i> - mutated n=18	<i>P</i>	<i>BRAF</i> - wildtype n=162	<i>BRAF</i> - mutated n=6	<i>P</i>
Age (years), median range	56.6 39.6 – 66	54.6 39.1 – 63.1	.61	56.6 39.1 – 66	56.1 45.7-65.8	.86	56.6 39.1 – 66.0	56.1 43.7 – 64.4	.77
Sex									
Female	37	4	.75	37	4	1	41	0	.34
Male	117	10		113	14		121	6	
Binet stage									
B	119	9	.33	114	14	1	124	4	.63
C	35	5		36	4		38	2	
Lymphocytes (x10 ⁹ /L), median Range	53.3 3.68 – 849	45.9 53.3 - 396	.69	50.1 36.8 – 849	58.2 43.4 - 605	.66	53.87 36.8 - 849	26.02 6.10 - 838.8	.11
Haemoglobin (g/L), median Range	13.5 7.5 - 16.6	12.1 7.9 - 15.6	.06	13.3 7.5 - 16.6	13.6 9.3 - 14.8	.91	13.3 7.5 - 16.6	13.5 12.8 - 16.4	.29
Platelets (x10 ⁹ /L), median Range	168 29 - 404	157.5 7.9 - 356	.73	168 7.91 - 404	180.5 70 - 301	.39	170 7.91 - 404	123 83 - 271	.3
CD38⁺ high (>30%), median Range	17 0 - 100	70 4 - 99	.009	19 0 - 100	16 0 - 87	.99	18 0 - 100	57.5 1 - 88	.36
sCD23⁺ , median range	257 47 - 910	237.5 80 - 440	.8	258 47 - 910	256 102 - 489	.90	257 47 - 910	510.5 250 - 771	.27
ZAP-70⁺ Positiv (≥20%) negativ	79 32	8 1	.44	77 31	10 2	.51	85 31	2 2	.30
IGHV mutated unmutated (≥ 98% homology)	51 94	2 11	.22	52 90	1 15	.056	53 100	1 5	.66
del(13)(q14.3) absent present, mono-allelic present, bi-allelic	59 65 11	9 4 0	0.2	63 60 9	5 9 2	.28	65 67 11	3 2 0	.78
del(11)(q22.3) absent present	103 34	7 6	.11	101 33	9 7	.13	106 40	4 0	.57
+12 absent present	128 14	11 1	1	123 15	16 0	.37	135 14	4 1	.41
del(17)(p13.1) absent present	126 12	13 0	.6	123 12	16 0	.37	137 10	2 2	.032

Supplementary Table S4.

Association between acquired mutations (P values of Fisher's exact test for independence) among the 168 patients cohort.

Positive and negative associations between acquired mutations in the 168 patients cohort

	SF3B1	XPO1	MYD88ex5	TP53	EGR2	MED12	NFKBIE	BRAF
Notch1ex34	0.47	0.36	1.00	0.36	1.00	1.00	0.67	0.091
SF3B1		0.012	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.59
XPO1			1.00	0.61	1.00	1.00	0.65	1.00
MYD88ex5				1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
TP53					0.61	1.00	1.00	0.41
EGR2						0.23	0.65	1.00
MED12							1.00	1.00
NFKBIE								1.00

White cells correspond to positive (significant or not) associations

Grey cells correspond to negative (significant or not) associations

Identified *BRAF* mutations in 24 CLL patients from the whole-exome study and 168 CLL patients from the validation study

Gene	AA change	Patient-ID
<i>BRAF</i>	NM_004333:c.G1405A:p.G469R	CLL002
<i>BRAF</i>	NM_004333:c.G1397T:p.G466V	CLL13
<i>BRAF</i>	NM_004333:c.G1378A:p.G460R	autoLLC22908
<i>BRAF</i>	NM_004333:c.A1447G:p.K483E	autoLLC11702
<i>BRAF</i>	NM_004333:c.T1785G:p.F595L	autoLLC14502
<i>BRAF</i>	NM_004333:c.A1781G:p.D594G	autoLLC25201
<i>BRAF</i>	NM_004333:c.A1801G:p.K601E	autoLLC15607
<i>BRAF</i>	NM_004333:c.C1822T:p.H608Y	autoLLC15104

Supplementary Table S5. Differentially expressed genes CLL EGR2-E356 Vs ERG2 WT

geneID	Ratio	FC	baseMeanA	baseMeanB	Adj,P,Value	EGR2_targets(chipseq)
DUSP4	77,39	77,39	56,25	4353,22	5,36E-06	*
METRNL	65,08	65,08	15,42	1003,3	3,39E-22	*
RAI2	60,38	60,38	2,69	162,59	6,14E-05	
SLC7A5	48,42	48,42	31,68	1533,98	1,16E-05	*
GRASP	47,33	47,33	15,74	745,23	2,51E-09	*
AACSP1	39,8	39,8	5,15	204,78	8,47E-07	
FOSL2	39,18	39,18	47,87	1875,23	1,43E-12	*
NR4A3	36,28	36,28	86,63	3143,3	3,27E-07	*
SOC3	31,31	31,31	114,7	3590,99	4,60E-03	*
RGCC	28,94	28,94	325,03	9405,52	4,73E-05	*
MAFF	27,58	27,58	74,02	2041,54	9,44E-06	*
SIK1	25,66	25,66	1043,65	26783,75	1,03E-03	
RGS2	25,11	25,11	1666,67	41852,65	2,57E-17	*
NR4A2	23,45	23,45	308,2	7227,21	4,53E-06	*
GABARAPL1	23,43	23,43	78,7	1844,28	1,29E-15	*
PIM3	21,87	21,87	233,94	5115,95	1,24E-10	*
TNFRSF12A	20,56	20,56	2,08	42,75	5,04E-03	*
GADD45A	19,14	19,14	76	1455,01	6,21E-05	*
C17orf91	18,84	18,84	168,88	3182,22	4,28E-13	*
OXCT2	16,99	16,99	5,57	94,62	3,30E-04	
KLF10	16,57	16,57	1154,48	19132,3	1,05E-09	*
FSCN1	14,33	14,33	3,69	52,92	6,54E-03	*
MIDN	14,18	14,18	117,69	1668,84	1,91E-05	*
EDN1	13,95	13,95	48,24	672,99	7,60E-03	
EMILIN2	13,74	13,74	159,41	2189,78	8,54E-06	*
ENC1	13,22	13,22	467,82	6186,68	2,33E-03	
PER1	12,17	12,17	188,4	2293,5	1,05E-09	*
CCDC19	11,48	11,48	16,78	192,54	6,19E-05	*
RGS1	11,44	11,44	863,51	9881,09	9,62E-05	
ATF3	11,24	11,24	175,19	1968,74	1,23E-03	*
CSF1	11,05	11,05	10,83	119,66	9,08E-03	
GADD45B	10,97	10,97	467,68	5128,24	2,64E-03	*
CSRNP1	10,97	10,97	839,34	9209,64	1,90E-08	*
MYBL2	10,58	10,58	46,74	494,44	5,63E-03	
KDM6B	10,43	10,43	134,64	1403,73	4,09E-04	*
ELL2	9,85	9,85	695,23	6849,71	3,99E-08	*
UBALD2	9,7	9,7	407,72	3955,79	1,91E-08	*
ITPRIP	9,28	9,28	218,94	2031,31	1,74E-07	*
LOC284454	9,27	9,27	46,23	428,51	1,28E-04	*
CDKN1A	9,25	9,25	313,08	2894,41	2,70E-04	*
CTNNA1	9,14	9,14	29,03	265,21	6,21E-05	
ICOSLG	9,12	9,12	291,39	2656,43	6,19E-05	*
ADAMTSL4	8,46	8,46	13,81	116,77	1,73E-03	*
LOC90834	8,31	8,31	20,75	172,37	6,71E-03	*
FOSL1	8,3	8,3	8,3	68,97	9,43E-03	*
RARA	8,3	8,3	199,31	1654,1	9,24E-03	*
TSPYL2	8,2	8,2	1758,62	14422,39	1,88E-04	

BRE-AS1	8,19	8,19	26,21	214,67	5,15E-03	*
DUSP1	8,07	8,07	3737,16	30144,08	3,35E-03	*
PLK3	7,95	7,95	206,13	1639,47	1,76E-06	*
MAP1LC3A	7,93	7,93	20,82	165,18	1,32E-03	
TRIB1	7,92	7,92	917,34	7264,21	1,15E-07	*
SLC7A5P2	7,9	7,9	75,44	595,98	6,01E-05	*
CREM	7,58	7,58	194,52	1475,12	1,91E-05	*
KLF6	7,57	7,57	8796,98	66579,77	1,60E-04	*
KANK2	7,36	7,36	301,24	2217,09	1,10E-03	
PELI1	7,28	7,28	7956,37	57896,26	9,23E-06	*
SNHG15	7,25	7,25	61,02	442,32	3,60E-03	*
MYADM	7,04	7,04	130,76	920,21	7,01E-03	*
DUSP5	6,98	6,98	786,73	5491,83	7,19E-06	*
STX11	6,96	6,96	461,84	3214,43	5,00E-03	*
IDI2-AS1	6,92	6,92	60,83	421,06	6,13E-03	*
PPP1R15A	6,86	6,86	6379,18	43739	1,69E-05	
JUND	6,79	6,79	2045,43	13887,54	6,78E-06	*
EZR	6,74	6,74	16514,92	111230,05	1,30E-05	*
RAPGEF2	6,53	6,53	1494,71	9762,16	1,63E-05	
ADAM9	6,5	6,5	99,38	645,68	7,57E-05	
HERPUD1	6,46	6,46	1423,03	9190,2	1,07E-05	*
FGFR1	6,43	6,43	116,43	748,85	5,08E-03	*
SELK	6,39	6,39	570,2	3641,66	1,91E-05	*
AGO2	6,38	6,38	371,09	2365,89	7,04E-03	*
JUNB	6,29	6,29	2023,47	12733,96	2,23E-05	*
ZFP36	6,28	6,28	2729,16	17130,59	2,31E-05	*
RBM38	6,23	6,23	1513,25	9421,82	2,29E-05	*
H1FX	6,23	6,23	671,88	4185,09	6,80E-06	
MAP1LC3B	6,14	6,14	1183,09	7263,38	5,37E-05	*
TXNDC5	6,13	6,13	102,34	626,89	1,74E-03	
DDX21	6,12	6,12	4117,84	25192,53	4,15E-05	
CLEC2B	6,04	6,04	1296,01	7825,21	2,83E-03	
JOSD1	6,04	6,04	1196,39	7226,86	2,74E-05	*
SCARNA17	6,02	6,02	80,08	481,85	1,95E-03	*
CD83	6,01	6,01	4966,42	29863,62	1,30E-05	*
BACH1	5,98	5,98	4846,49	28990,93	7,19E-06	*
PTP4A1	5,95	5,95	2863,17	17033,08	3,05E-03	*
DBF4	5,93	5,93	885,52	5253,98	4,16E-05	*
IDI1	5,92	5,92	1578,43	9350,16	5,37E-05	*
UBE2S	5,89	5,89	63,37	372,98	5,63E-03	*
AKIRIN2	5,86	5,86	396,64	2324,46	6,98E-05	*
C17orf107	5,75	5,75	51,31	294,85	6,40E-03	*
APBB2	5,75	5,75	2014,37	11580,14	4,25E-05	*
ENDOU	5,71	5,71	37,52	214,36	6,62E-03	
AMIGO3	5,69	5,69	85,19	484,42	1,20E-03	
RAPGEF5	5,64	5,64	197,76	1116,24	8,56E-04	*
BBC3	5,64	5,64	113,79	641,73	2,59E-04	*
EXT1	5,62	5,62	111,48	627,01	1,97E-04	*
DUSP2	5,6	5,6	520,96	2916,12	9,69E-03	*
NOP58	5,59	5,59	1811,78	10119,48	1,95E-04	
ABHD17B	5,58	5,58	423,56	2362,59	5,73E-03	

PFDN2	5,57	5,57	171,83	957,59	1,87E-04	*
IFRD1	5,52	5,52	1028,24	5676,33	5,48E-03	*
CWC25	5,5	5,5	476,49	2620,92	1,65E-04	*
TGFBR3	5,49	5,49	1212,26	6657,57	1,91E-05	
NEAT1	5,48	5,48	1154,34	6330,51	2,64E-04	*
C16orf80	5,44	5,44	299,56	1630,19	9,08E-03	*
NRROS	5,41	5,41	153,38	829,23	4,05E-04	
ATP6V0C	5,41	5,41	209,5	1133,75	2,68E-04	
FYTTD1	5,37	5,37	1977,61	10626,24	1,12E-03	*
MEF2D	5,32	5,32	755,79	4018,43	4,14E-03	*
ADNP2	5,32	5,32	915,86	4869,8	1,02E-04	
KLF2	5,31	5,31	632,95	3358,75	2,64E-04	*
PTGER4	5,3	5,3	935,63	4959,7	2,63E-03	*
ZBTB43	5,3	5,3	1443,8	7657,89	1,02E-03	
PIGA	5,29	5,29	476,38	2519,52	1,03E-04	
UBC	5,29	5,29	24004,57	126884,91	4,61E-05	*
C15orf39	5,23	5,23	81,1	424,08	3,30E-04	
SLC3A2	5,22	5,22	739,99	3861,38	1,67E-04	*
ZFAND2A	5,2	5,2	337,83	1758,36	1,74E-04	*
NAP1L5	5,18	5,18	98,28	509,1	3,01E-03	
EFHD2	5,17	5,17	479,33	2476,99	6,36E-03	*
THEMIS2	5,16	5,16	952,44	4916,46	9,69E-03	*
TSC22D3	5,16	5,16	9232,81	47662,43	5,09E-04	*
GMEB2	5,1	5,1	238,51	1216,48	1,05E-03	*
CCNL1	5,1	5,1	3641,47	18561,39	2,59E-04	*
WHAMM	5,05	5,05	1200,09	6059,24	1,25E-03	
WDR45B	5,05	5,05	583,09	2945,69	6,29E-04	*
CASZ1	5,04	5,04	194,49	980,29	1,98E-03	*
ARL4C	5,01	5,01	2397,36	12011,04	5,62E-04	*
NFKB1	5,01	5,01	1544,01	7737,78	2,84E-04	*
ETV3	5	5	152,89	763,85	2,96E-03	*
PRNP	4,97	4,97	1114,07	5535,64	3,77E-03	*
PDE4B	4,94	4,94	7428,17	36689,36	3,74E-04	*
SLC25A33	4,91	4,91	230,03	1129,42	1,08E-03	*
H3F3B	4,9	4,9	34024,6	166626,85	2,04E-04	*
MAP4K3	4,84	4,84	143,51	695,07	6,03E-03	*
EIF1B	4,82	4,82	424,28	2046,36	1,47E-03	*
BTG3	4,82	4,82	170,77	823,97	5,09E-04	*
CSNK1D	4,81	4,81	318,27	1530,51	1,90E-03	*
TIPARP	4,81	4,81	1484,17	7142,36	5,00E-04	*
ZC3H12A	4,8	4,8	337,67	1622,02	6,03E-04	*
SBDS	4,8	4,8	2275,86	10930,04	2,19E-04	
CDYL2	4,79	4,79	106,58	510,6	1,08E-03	*
ETF1	4,77	4,77	1757,14	8385	4,35E-04	*
SULF2	4,75	4,75	239,9	1140,42	4,58E-03	*
GAB2	4,72	4,72	2188,38	10335,73	2,02E-03	*
SNORA22	4,71	4,71	351,63	1657,57	1,87E-04	
CYTIP	4,66	4,66	4239,02	19761,5	3,87E-04	*
CBX4	4,65	4,65	1154,14	5370,9	5,73E-03	*
NR1H2	4,65	4,65	409,27	1902,82	1,05E-03	*
CCDC9	4,64	4,64	88,92	412,3	5,48E-03	*

JMY	4,64	4,64	2699,38	12523,18	1,08E-03	
LOC646329	4,63	4,63	154,21	714,22	9,43E-03	*
SRF	4,6	4,6	338,24	1555,47	9,08E-03	
GFOD1	4,6	4,6	380,34	1748	2,24E-03	*
MAPK6	4,59	4,59	1645,25	7558,87	2,07E-04	*
LAPTM4A	4,57	4,57	1149,7	5255,78	4,51E-03	*
DDIT3	4,56	4,56	321,9	1466,26	2,56E-03	*
TP53BP2	4,44	4,44	989,6	4392,55	1,15E-03	*
EVC2	4,44	4,44	121,94	541,89	1,05E-03	*
KPNA2	4,41	4,41	401,67	1772,59	1,67E-03	*
RASGEF1B	4,39	4,39	847,97	3726,13	8,83E-03	*
MZB1	4,39	4,39	142,14	623,36	1,97E-03	
SCARNA21	4,38	4,38	286,37	1253,76	9,81E-03	
SYTL3	4,38	4,38	126,64	555,02	2,83E-03	*
EIF1	4,34	4,34	4265,92	18534,41	3,50E-03	*
TAF13	4,31	4,31	197,95	853,27	2,16E-03	*
PLIN2	4,29	4,29	296,7	1273,58	3,29E-03	
ALYREF	4,27	4,27	413,23	1763,67	3,01E-03	
BCL7B	4,27	4,27	409,34	1749,05	2,64E-03	*
MED30	4,24	4,24	218,43	925,84	1,13E-03	*
SPTY2D1	4,23	4,23	1107,61	4690,64	1,74E-03	*
RBM3	4,22	4,22	4496,79	18963,65	3,26E-03	
PLEKHG2	4,21	4,21	282,19	1188,5	1,64E-03	*
NFKBIB	4,2	4,2	162,52	682,38	4,60E-03	*
RELB	4,19	4,19	335,4	1403,8	5,93E-03	*
ODC1	4,16	4,16	5617,11	23382,88	2,79E-03	
SIAH2	4,13	4,13	944,71	3905,86	7,60E-03	*
MTMR6	4,12	4,12	1099,81	4528,04	8,63E-03	*
PI4K2A	4,12	4,12	567,58	2340,92	5,26E-03	*
GZF1	4,1	4,1	685,9	2809,51	6,10E-03	*
EZH2	4,09	4,09	260,46	1064,41	5,73E-03	*
FEM1C	4,09	4,09	1435,35	5875,17	3,86E-03	
MAPRE1	4,05	4,05	2382,2	9648,73	3,67E-03	*
CCRN4L	4,03	4,03	143,24	576,84	3,39E-03	*
BNIP1	4,01	4,01	145,73	583,93	6,03E-03	
ATP6V1F	3,99	3,99	301,55	1203,22	3,42E-03	
CDK16	3,97	3,97	273,85	1087,18	4,14E-03	*
RSRC2	3,96	3,96	2626,25	10398,9	3,96E-03	*
HIST1H2BD	3,95	3,95	2258,19	8920,7	1,96E-03	
ZBTB21	3,9	3,9	1696,65	6609,94	6,71E-03	*
ARMC5	3,9	3,9	103,02	401,5	6,36E-03	*
HIST2H2AC	3,9	3,9	2719,46	10600,74	4,85E-03	*
WTAP	3,89	3,89	2034,5	7920,58	2,36E-03	*
IER5	3,88	3,88	1498,05	5809,72	1,05E-03	
RPL28	3,85	3,85	2152,61	8276,99	1,95E-03	
ELL	3,83	3,83	283,62	1085,66	8,44E-03	*
RNF138	3,83	3,83	1913,88	7332,32	5,63E-03	*
NFKB2	3,83	3,83	601,61	2304,89	3,37E-03	
B3GNT2	3,82	3,82	868,5	3315,93	2,56E-03	*
EMP3	3,81	3,81	1653,69	6307,84	9,12E-03	*
CCDC94	3,81	3,81	297,78	1134,07	6,98E-03	*

COPS2	3,8	3,8	2336,62	8875,66	4,36E-03	
CLK1	3,79	3,79	5366,27	20351,62	9,84E-03	*
HMGB2	3,78	3,78	2181,69	8245,45	2,79E-03	
SNRPB	3,77	3,77	719,99	2717,19	8,39E-03	*
MASTL	3,69	3,69	837,36	3089,34	4,30E-03	*
TRA2B	3,68	3,68	4713,37	17327,37	6,20E-03	*
BTG2	3,67	3,67	12978,43	47657,72	8,11E-03	
PEA15	3,67	3,67	765,43	2810,02	5,04E-03	*
RHOG	3,66	3,66	141,62	518,45	9,34E-03	*
BZW1	3,66	3,66	1620,84	5938,52	6,40E-03	*
SNORA8	3,65	3,65	256,06	934,02	8,05E-03	
RNF11	3,65	3,65	1049,74	3831,37	4,49E-03	*
CSGALNACT2	3,64	3,64	1018,75	3709,05	9,90E-03	*
MORF4L1	3,64	3,64	1852,75	6750,47	9,69E-03	*
TNFSF9	3,63	3,63	378,63	1375,12	7,11E-03	
ATF4	3,62	3,62	3816,96	13835,72	6,69E-03	*
CHMP4B	3,62	3,62	478,42	1732,43	5,00E-03	*
PMAIP1	3,6	3,6	10476,38	37699,37	3,60E-03	*
DDX24	3,57	3,57	5125,16	18313,86	8,62E-03	*
HIST2H2BE	3,54	3,54	761,86	2696,52	9,69E-03	*
EBF1	3,47	3,47	1219,41	4233,45	5,09E-03	*
ARHGDI1	3,46	3,46	654,62	2263,63	9,54E-03	*
YBX1	3,26	3,26	6774,25	22088,32	9,26E-03	*
XBP1	3,26	3,26	1054,79	3443,5	8,14E-03	
DUSP19	0,11	-9,46	178,98	18,93	2,66E-03	*
GRIK1-AS2	0,05	-18,85	87,43	4,64	9,76E-04	
KIAA0040	0,18	-5,67	8608,56	1517,94	4,53E-03	*
PAIP2B	0,16	-6,22	2407,67	386,89	7,22E-03	*
PANK1	0,12	-8,51	258,33	30,36	4,25E-03	*
PAQR8	0,16	-6,44	429,58	66,74	5,04E-03	*
PEX11A	0,07	-13,34	86,57	6,49	4,14E-03	
SNORD57	0,03	-39,98	52,8	1,32	6,73E-03	*
TREML2	0,12	-8,14	910,25	111,88	4,22E-03	
ZKSCAN3	0,14	-7,27	221,59	30,46	7,96E-03	
ZNF234	0,14	-7,18	394,53	54,93	2,45E-03	*
ZNF404	0,1	-9,99	166,49	16,66	2,33E-03	
ZNF559	0,16	-6,44	1249,3	194,09	2,45E-03	*
ZNF781	0,15	-6,7	192,89	28,78	5,08E-03	
ZNF860	0,19	-5,22	1280,78	245,29	9,26E-03	*

Supplementary,Table,S5,(suite).,Predicted(EGR2(Target(in(CL

AP3M2
ATXN1L
BTG2
CD69
CITED2
COASY
DUSP2
EGR1
FOSB
GEM
H3F3B
HEXIM1
HIST1H1C
LOC100132288
MLH3
MRPS14
NR4A1
RMND5A
SNX3
SOCS1
TBC1D15
TRIB1
XPNPEP3
ZNF586

Supplementary,Table,S5,(suite).,Signature of BCR activation

Symbol

EGR1

EGR2

EGR3

NR4A3

HES1

MYC

DUSP2

CKS2

NR4A1

SPRY2

FOSB

TNF

KBTBD8

ADORA2A

NR4A2

GEM

CD69

BCL2A1

CSRNP1

ARL4C

CDKN1A

CD48

SLAMF1

PPP1R15A

GZF1

GPR18

RASGEF1B

DDIT3

LY9

OTUD1

TIPARP

ZFP36

II. Article 2 – 14q deletions are associated with trisomy 12, *NOTCH1* mutations and unmutated *IGHV* genes in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma

Genes, Chromosomes & Cancer, 2014, 53(8):657-666

La délétion du bras long du chromosome 14 (del14q) est une anomalie récurrente mais rare dans la LLC (environ 2% des cas). Cette anomalie étant retrouvée à une faible fréquence, les cohortes rapportées comptent peu d'effectifs et les conséquences moléculaires ne sont pas connues.

Notre étude s'est intéressée à caractériser au niveau clinique, cytogénétique, et moléculaire une cohorte de 81 patients présentant une LLC ou un SLL avec del(14q), dans le cadre du Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique. Nous avons plus particulièrement cherché à savoir si il existait une région minimale de délétion par SNP-array et FISH, si un gène était impliqué dans cette région, et enfin si la del(14q) est une anomalie de bon ou de mauvais pronostic.

Même si la taille des délétions était hétérogène, on retrouvait de façon remarquable la même délétion del(14)(q24.1q32.33) dans la moitié des cas, avec un point de cassure récurrent au niveau du gène *ZFP36L1* en 14q24.1, et un point de cassure au niveau du locus des *IGH* en 14q32.3. Cependant, bien que l'enhancer des *IGH* soit juxtaposé aux gènes *ZFP36L1* ou *RAD51B*, il n'existait pas de surexpression significative de ces deux gènes. D'un point de vue cytogénétique et moléculaire, la del(14q) était fréquemment associée à la trisomie 12, et l'on retrouvait une forte prévalence de mutations *NOTCH1*, indépendamment de la tri12. La del(14q) était également associée à un statut non-muté des *IGHV* avec une surreprésentation du répertoire *IGHV1-69*. Enfin, concernant les corrélations cliniques et dans le cadre d'une étude rétrospective multicentrique, les LLC avec del(14q) et trisomie 12 avaient un temps entre le diagnostic et le premier traitement plus court que les LLC avec trisomie 12 sans del(14q).

Discussion

La délétion 14q étant une anomalie rare, ce travail illustre l'intérêt des études coopératives internationales, permettant de collecter par cette voie un nombre important de patients, afin de pouvoir réaliser une analyse conséquente. Nous proposons à l'issue de ce travail de rechercher cette anomalie de façon systématique dans les protocoles prospectifs. Avec les grandes avancées dans les nouvelles

techniques à haut débit, il doit être possible de combiner la recherche de mutations géniques et d'anomalies chromosomiques, à type de gains et de pertes dans un premier temps.

La délétion 14q peut être isolée, ou associée à d'autres anomalies chromosomiques, pouvant alors dans de rares cas être sous-clonale. La délétion 14q est fréquemment associée à la trisomie 12 et aux mutations de *NOTCH1*, suggérant des coopérations oncogéniques. De manière plus générale, la trisomie 12 est souvent associée à des anomalies récurrentes, comme la délétion 14q, mais aussi les translocations t(14;19), t(14;18), les trisomies 18, 19... Ces anomalies sont souvent méconnues car non recherchées, et ont des pronostics différents, ce qui pourrait expliquer en partie la valeur pronostique indéterminée ou intermédiaire de la trisomie 12. Les caryotypes ne sont pas réalisés de manière systématique dans les LLC, et les analyses par FISH recommandées à l'heure actuelle dans la prise en charge des LLC ne recherchent pas ces anomalies.

Nous n'avons pas mis en évidence de conséquence fonctionnelle de la délétion 14q. Les hypothèses étaient soit l'activation transcriptionnelle d'un gène (ou d'un microARN) juxtaposé à un « enhancer » des gènes *IGH* de par la délétion, soit l'inactivation d'un gène (ou d'un microARN) localisé dans la zone déléetée, soit l'inactivation du gène *ZFP36L1*, qui est localisé de façon remarquable au niveau du point de cassure de la majorité des délétions. *ZFP36L1* code pour une protéine à doigt de zinc qui régule l'expression de différents gènes impliqués dans l'apoptose. Plusieurs travaux ont mis en évidence que ce gène pourrait avoir un rôle de tumeur suppresseur par la dégradation de l'ARNm *Bcl-2* par exemple^{201,202}. Nous n'avons observé ni activation transcriptionnelle des gènes localisés au point de cassure, ni mutation du gène *ZFP36L1*, dans l'hypothèse d'une inactivation des deux allèles. Les autres pistes restent ouvertes.

14q Deletions are Associated with Trisomy 12, *NOTCH1* Mutations and Unmutated *IGHV* Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia and Small Lymphocytic Lymphoma

Adrien Cosson,^{1†} Elise Chapiro,^{1,2,3†} Nabila Belhouachi,² Hong-Anh Cung,² Boris Keren,⁴ Frederik Damm,⁵ Caroline Algrin,² Christine Lefebvre,⁶ Sandra Fert-Ferrer,⁷ Isabelle Luquet,⁸ Nathalie Gachard,⁹ Francine Mugneret,¹⁰ Christine Terre,¹¹ Marie-Agnes Collonge-Rame,¹² Lucienne Michaux,¹³ Isabelle Rafdord-Weiss,¹⁴ Pascaline Talmant,¹⁵ Lauren Veronese,¹⁶ Nathalie Nadal,¹⁷ Stephanie Struski,¹⁸ Carole Barin,¹⁹ Catherine Helias,²⁰ Marina Lafage,²¹ Eric Lippert,²² Nathalie Auger,²³ Virginie Eclache,²⁴ Damien Roos-Weil,^{3,25} Veronique Leblond,^{3,25} Catherine Settegrana,² Karim Maloum,² Frederic Davi,^{1,2,3} Helene Merle-Beral,^{1,2,3} Claude Lesty,^{2,3} and Florence Nguyen-Khac,^{1,2,3*} on behalf of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique

¹INSERM U872, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris 6, France

²Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France

³UPMC, Paris 6, France

⁴Département de Génétique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France

⁵INSERM U985, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

⁶Laboratoire de Cytogénétique, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France

⁷Laboratoire de Cytogénétique, Centre Hospitalier, Chambéry, France

⁸Laboratoire de Cytogénétique, Centre Hospitalier Universitaire, Reims, France

⁹Laboratoire de Cytogénétique, Centre Hospitalier Universitaire, Limoges, France

¹⁰Laboratoire de Cytogénétique, Hôpital du Bocage, Dijon, France

¹¹Laboratoire de Cytogénétique, Centre Hospitalier, Versailles, France

¹²Laboratoire de Cytogénétique, Centre Hospitalier Universitaire, Besançon, France

¹³Center for Human Genetics, KU Leuven, Belgium

¹⁴Laboratoire de Cytogénétique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

¹⁵Laboratoire de Cytogénétique, Hôpital Hôtel Dieu, Nantes, France

¹⁶Laboratoire de Cytogénétique, Centre Hospitalier Universitaire, Clermont-Ferrand, France

¹⁷Laboratoire de Cytogénétique, Hôpital Nord, Centre Hospitalier Universitaire, Saint-Etienne, France

¹⁸Génétique des Hémopathies, Hôpital Purpan, Toulouse, France

¹⁹Laboratoire de Cytogénétique, Hôpital Bretonneau, Tours, France

²⁰Laboratoire de Cytogénétique, Centre Hospitalier Universitaire, Strasbourg, France

²¹Département d'oncologie moléculaire, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France

²²Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Bordeaux, France

²³Laboratoire de Cytogénétique, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

²⁴Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire Avicenne, Université Paris 13, Bobigny, France

²⁵Service d'Hématologie Clinique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Deletions of the long arm of chromosome 14 [del(14q)] are rare but recurrently observed in mature B-cell neoplasms, particularly in chronic lymphocytic leukemia (CLL). To further characterize this aberration, we studied 81 cases with del(14q): 54 of CLL and 27 of small lymphocytic lymphoma (SLL), the largest reported series to date. Using karyotype and fluorescence in situ hybridization (FISH), the most frequent additional abnormality was trisomy 12 (tri12), observed in 28/79 (35%) cases, followed by del13q14 (12/79, 15%), delTP53 (11/80, 14%) delATM (5/79, 6%), and del6q21 (3/76, 4%). *IGHV* genes were unmutated in 41/53 (77%) patients, with a high frequency of *IGHV1-69* (21/52, 40%). *NOTCH1* gene was

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Supported by: Roche France (SNP-array).

†A.C. and E.C. contributed equally to this work.

*Correspondence to: Florence Nguyen-Khac, MD, PhD; Service d'Hématologie Biologique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47-83, Bld de l'Hôpital, 75013 Paris, France. E-mail: florence.nguyen-khac@psl.aphp.fr

Received 23 December 2013; Accepted 1 April 2014

DOI 10.1002/gcc.22176

Published online 12 April 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

mutated in 14/45 (31%) patients. There was no significant difference in cytogenetic and molecular abnormalities between CLL and SLL. Investigations using FISH and SNP-array demonstrated the heterogeneous size of the 14q deletions. However, a group with the same del(14)(q24.1q32.33) was identified in 48% of cases. In this group, trisomy 12 ($P = 0.004$) and *NOTCH1* mutations ($P = 0.02$) were significantly more frequent than in the other patients. In CLL patients with del(14q), median treatment-free survival (TFS) was 27 months. In conclusion, del(14q) is associated with trisomy 12 and with pejorative prognostic factors: unmutated *IGHV* genes (with over-representation of the *IGHV1-69* repertoire), *NOTCH1* mutations, and a short TFS. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

INTRODUCTION

Deletions of the long arm of chromosome 14 [del(14q)] are rare but are recurrently observed in mature B-cell neoplasms, particularly in chronic lymphocytic leukemia (CLL), where it is found in about 2% of cases (Reindl et al., 2010). So far, only a few studies have focused on the characterization of this abnormality in B-lymphoid diseases (Tilly et al., 1988; Pospisilova et al., 2007; Reindl et al., 2010). The molecular consequences of 14q deletions are largely unknown. In the two series in which biological and clinical data from patients were documented, del(14q) was associated with trisomy 12, an unmutated *IGHV* status, and with short time to treatment (Pospisilova et al., 2007; Reindl et al., 2010).

In CLL, cytogenetic aberrations are highly relevant prognostic markers. Some are well known and are systematically detected using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 11q, 13q, and 17p deletions and trisomy 12. Within the hierarchical model of genetic subgroups commonly used in clinical practice, trisomy 12, the third most frequent aberration, confers an intermediate prognosis (Dohner et al., 2000). Trisomy 12 is in fact often associated with other chromosomal abnormalities: if they were systematically searched for, they could refine outcome prediction. Thus, t(14;18)(q32;q21) [or its variants t(2;18) and t(18;22)] and t(14;19)(q32;q13), which lead to the overexpression of *BCL2* and *BCL3*, respectively, are not uncommon in CLL with trisomy 12 (Martin-Subero et al., 2007; Chapiro et al., 2008; Put et al., 2009; Nguyen-Khac et al., 2011). Translocation t(14;18) seems to confer a good prognosis whereas t(14;19) would be associated with an adverse clinical impact. Other aberrations, like trisomy 18 and/or 19, and a 14q deletion, are also associated with trisomy 12 (Pospisilova et al., 2007; Sellmann et al., 2007; Reindl et al., 2010; Lopez et al., 2012).

Because only a few studies have been conducted with limited numbers of patients, and these have not specifically targeted CLL, we undertook a clinical, cytogenetic, and molecular

study of 81 cases of CLL and small lymphocytic lymphoma (SLL) that harbored a 14q deletion to further characterize this rare abnormality.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique collected data from 81 CLL and SLL patients diagnosed between 1994 and 2011. All exhibited a 14q deletion assessed by karyotype except for two cases (one was not investigated and one was normal). The 14q deletion was detected using SNP-array in these two patients. All patients gave their informed consent in agreement with the Helsinki declaration, and the Institutional Ethics Committee at Pitie-Salpetriere Hospital approved this study.

A morphological review of 65 cases was performed at diagnosis by two cytologists (K.M. and C.S.), and an immunological review was performed for 48 cases by H.M.-B.

Chromosome Banding Analysis and FISH

Chromosome banding analyses were performed according to the usual techniques to obtain R- and/or G-banded chromosomes from peripheral blood ($n = 57$ samples), bone-marrow ($n = 12$), lymph node ($n = 10$), or splenic cells ($n = 1$). The samples were cultured for 48–96 hr and stimulated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate ($n = 7$ patients) or CpG-oligonucleotides and interleukin 2 ($n = 65$), except for eight samples (six lymph node samples, one bone marrow, and one spleen), which were cultured for 24 hr without stimulation (Mayr et al., 2006). All karyotypes were reviewed by members of GFCH, and were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013).

FISH was performed on interphase nuclei and metaphases, following standard procedures and using specific probes: *IGH* (Dako, Trappes, France), CEP12, 13q14 (D13S319), *ATM*, TP53 (Abbott, Rungis, France), 6q21(SEC63) (Kreatech, Strasbourg, France). Home-grown bacterial

artificial chromosome probes, RP11-35D12 and RP11-226F19, covering the gene *ZFP36L1* in 14q24.1, were selected using the University of California Santa Cruz Genome Bioinformatic database (NCBI37/hg19 build) and obtained from Genoscope (Evry, France). This locus has already been described to be involved in 14q deletion in previous reports (Pospisilova et al., 2007; Reindl et al., 2010). Extraction, labeling, and hybridization were performed as previously described (Romana et al., 1993). Results were recorded using an Eclipse 90i fluorescence microscope (Nikon) fitted with appropriate filters, a CCD camera, and digital-imaging software from Alphelys (Genikon).

IGHV Mutation Status

IGHV gene mutation status was analyzed locally or in F.D.'s laboratory at Pitié-Salpêtrière Hospital, as described previously (Ghia et al., 2005). Sequences were aligned to the ImMunoGeneTics sequence directory and considered unmutated if homology with the germline was $\geq 98\%$. Of note, due to the multicentric nature of this study and the difficulty to have access to original nucleotide sequence data, search for stereotypy within *IGHV1-69* could not be performed.

Mutational Analyses

Genomic DNA (gDNA) was extracted from lymph node, blood, or bone marrow samples using an AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The mutation hot spots in the *NOTCH1* (exon 34), *SF3B1* (exons 14–16), *XPO1* (exons 14–15), *MYD88* (exon 5), *TP53* (exons 4–10), and *ZFP36L1* genes were analyzed by PCR amplification and direct sequencing. Each gDNA sample was subjected to whole-genome amplification using a REPLI-g Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), and then amplified and sequenced with the primers indicated in Supporting Information Table 1, using standard procedures. All mutations were validated for sequence on gDNA.

Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-Array Analyses

To genotype the 36 samples with available material, we used an Illumina Omni1-quad ($n = 11$) or an Illumina Omni-2.5–8 array ($n = 26$) (Illumina, San Diego, CA). Samples were processed using the Infinium assay according to the manufacturer's protocols (Illumina), and results

were analyzed using Illumina GenomeStudio software (see Supporting Information).

Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA was converted to cDNA by reverse transcription using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Saint Aubin, France), according to manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR was performed using Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays for *ZFP36L1* (Hs04276436_m1) and *RAD51B* (Hs00172522_m1). PCR reactions were carried out in duplicate, using TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Saint Aubin, France) according to manufacturer's recommendations. Products were amplified with a 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems) at 60°C for 40 cycles. Expression of targeted transcripts was normalized with *ABL1* reference gene expression with the $2^{-\Delta C_t}$ method (Beillard et al., 2003).

Statistical Analyses

For categorical variables, statistical analyses were carried out using Fisher's-exact or the χ^2 test. Continuous data were analyzed using the Mann–Whitney or Anova test. The χ^2 or Fisher's exact test were used to compare our data with those from the literature. Overall survival was measured from date of diagnosis to date of death or to the last follow-up (censoring). Treatment-free survival (TFS) was defined as the time between the date of diagnosis and the date of initiation of first treatment, or the death or the last follow-up at which patient was known to be untreated. Kaplan–Meier methodology and a log-rank test or Cox's regression were undertaken for survival analyses using the Statview software. The variables included in Cox's proportional hazard regression models were trisomy 12, a *TP53* deletion and/or mutation, *IGHV* mutation status, and *NOTCH1* mutations. All tests were two-sided. An effect was considered statistically significant if the *P* value was 0.05 or less.

RESULTS

Clinical Data

After morphological and immunophenotypical reviews, 49 patients were classified as having a CLL Matutes [or modified (Moreau et al., 1997)] score of 4–5, five patients had an atypical CLL

TABLE 1. Clinical and Laboratory Data from Patients with CLL or SLL and a 14q Deletion

		Total n = 81	CLL n = 54	SLL n = 27	P-value
Gender, n (%)	F	40/81 (49)	27/54 (50)	13/27 (48)	n.s.
Age at diagnosis, years (range)		64.5 (29–87)	65 (45–84)	64 (29–87)	n.s.
Binet stage at diagnosis, n (%)	A		35/52 (67)		
	B		9/52 (17)		
	C		8/52 (16)		
Binet stage at cytogenetic study, n (%)	A		20/50 (40)		
	B		13/50 (26)		
	C		17/50 (34)		
Splenomegaly, n (%)		14/73 (19)	11/47 (23)	3/26 (12)	n.s.
Lymphadenopathy, n (%)		52/73 (71)	29/47 (62)	23/26 (88)	0.017
Lymphocytosis, G/L (range)		7.7 (1.3–510)	11.4 (5.2–510)	3 (1.3–4.7)	0.0001
Hemoglobin, g/dL (range)		12.6 (5.8–15.7)	12.9 (6.5–15.7)	11.9 (5.8–14.7)	n.s.
Platelets, G/L (range)		188 (58–487)	204 (60–487)	176 (58–465)	n.s.
Median follow-up, months (range)		26.3 (0–199.6)	26.8 (0–199.6)	26 (1.2–177)	n.s.
Death, n (%)		8/78 (10)	5/51 (10)	3/27 (11)	n.s.
Median TFS, months (95%CI)		14 (5–36)	27 (14–48)	1 (1–12)	0.01
OS at 5 years, % (95%CI)		91.8 (85–99)	93.7 (87–100)	88.1 (73–100)	n.s.

TFS, Treatment-free survival; OS, overall survival; 95%CI, 95% confidence interval; n.s., not significant. Statistically significant values are in bold.

score of 3 (all CD5+, CD23+), and 27 patients were SLL (Supporting Information Table 2).

Details of the clinical characteristics and laboratory findings at diagnosis of the 81 patients are shown in Table 1. The gender ratio (M:F) was 1.02. Median age at diagnosis was 64.5 years (range: 29–87). Regarding all cases of CLL with available data, there were 35 (67%) cases of stage A, 9 (17%) of stage B, and 8 (16%) of stage C at diagnosis. At the time of the cytogenetic study, there were 20 (40%) cases with stage A, 13 (26%) with stage B, and 17 (34%) with stage C.

Comparisons between CLL score 4–5 and CLL score 3 showed there was no statistical differences regarding Binet stage, gender ratio, lymphocytosis, splenomegaly, lymphadenopathy, hemoglobin, or platelets (data not shown). Comparisons between all CLL and SLL showed there were no significant differences, except for lymphocytosis, lymphadenopathy, and median TFS (Table 1).

As del(14q) is associated with trisomy 12, we analyzed the TFS of CLL with trisomy 12 with or without del(14q). Of note, the frequency of del(14q) among the CLL patients with trisomy 12 and informative karyotypes from the database Pitie-Salpetriere 2002–2013 was 5/77 (6.5%). We observed that the 15 CLL patients with del(14q) associated with trisomy 12 in our series had a significantly shorter median TFS than 72 cases of CLL with trisomy 12 without a 14q deletion (data from the database of Pitie-Salpetriere Hospital) of 14 versus 36 months, respectively, $P < 0.01$ (Supporting Information Fig. 1). This shorter TFS was also observed after twelve patients with delTP53

or delATM were excluded from the analyses [median 14 months (95%CI: 0–37) vs. 36 (95%CI: 28–62) months, $P = 0.005$].

Cytogenetic and Molecular Data

Cytogenetic analyses were performed before any treatment in 63/81 (78%) patients. Of these 63 patients, 41 (65%) were analyzed at diagnosis. For the other 22 untreated patients, the median time between diagnosis and cytogenetics was 20.2 months.

Cytogenetic and molecular data are shown in Table 2. In 22/79 (28%) informative karyotypes, del(14q) was the sole chromosomal abnormality. When results from karyotype and FISH analyses were grouped, the most frequent associated abnormalities were: trisomy 12 (28/79, 35%), 13q14 deletions (12/79, 15%), TP53 deletions (11/80, 14%) (delTP53), ATM deletions (delATM) (5/79, 6%), and 6q21 deletions (del6q) (3/76, 4%). Including del(14q) in the analyses, the patients showed a median number of two cytogenetic alterations (range: 1–15), as detected by karyotype and/or FISH (Supporting Information Table 2, Table 2, Fig. 1). The median number of abnormalities detected by SNP-array was 3 (range: 1–17), with more losses than gains (median: 2 vs. 1; Supporting Information Tables 3 and 4).

IGHV genes were unmutated in 41/53 (77%) patients. Gene IGHV3-21 was found in 2/52 (4%) cases, gene IGHV4-39 in 3/52 (6%) cases, and gene IGHV1-69 in 21/52 (40%) cases. All 21 cases with IGHV1-69 exhibited an unmutated IGHV

TABLE 2. Cytogenetic and Molecular Analyses of Patients with CLL or SLL and a 14q Deletion

			Total n = 81	CLL n = 54	SLL n = 27	P-value
Karyotype	Isolated 14q deletion, n (%)		22/79 (28)	16/52 (31)	6/27 (22)	n.s.
	14q deletion + other changes, n (%)	same clone	31/57 (54.5)	18/36 (50)	13/21 (62)	n.s.
		primary change	17/57 (30)	11/36 (31)	6/21 (28.5)	n.s.
		secondary change	6/57 (10.5)	4/36 (11)	2/21 (10.5)	n.s.
		independant clone	3/57 (5)	3/36 (8)	0/21 (0)	n.s.
	Complex, n (%)		26/79 (33)	19/52 (37)	7/27 (26)	n.s.
	Translocations, n (%)		26/79 (33)	20/52 (38)	6/27 (22)	n.s.
	Unbalanced translocations, n (%)		16/79 (20)	14/52 (27)	2/27 (7.5)	n.s.
	Trisomy 12, n (%)		28/79 (35)	15/53 (28)	13/26 (50)	n.s.
	Karyotype and/or FISH					
SNP-array	13q deletion, n (%)		12/79 (15)	11/53 (21)	1/26 (4)	n.s.
	TP53 deletion, n (%)		11/80 (14)	8/54 (15)	3/26 (12)	n.s.
	ATM deletion, n (%)		5/79 (6)	4/53 (8)	1/26 (4)	n.s.
	6q21 deletion, n (%)		3/76 (4)	2/50 (4)	1/26 (4)	n.s.
	Number of chromosomal alterations, median (range)		2 (1–15)	2 (1–15)	2 (1–9)	n.s.
	Number of copy number variations, median (range)		3 (1–17)	3 (1–15)	2.5 (1–17)	n.s.
	Number of gains, median (range)		1 (0–6)	1 (0–6)	0.5 (0–1)	n.s.
	Number of losses, median (range)		2 (0–17)	2 (0–10)	2 (1–17)	n.s.
	IGHV genes					
	Unmutated, n (%)		41/53 (77)	31/41 (76)	10/12 (83)	n.s.
NOTCH1	VH1-69, n (%)		21/52 (40)	16/40 (40)	5/12 (42)	n.s.
	Mutated, n (%)		14/45 (31)	10/34 (29)	4/11 (36)	n.s.
	SF3B1	Mutated, n (%)	2/45 (4)	2/34 (6)	0/11 (0)	n.s.
	XPO1	Mutated, n (%)	2/45 (4)	2/34 (6)	0/11 (0)	n.s.
	MYD88	Mutated, n (%)	0/45 (0)	0/34 (0)	0/11 (0)	n.s.
	TP53	Mutated, n (%)	6/43 (14)	5/32 (16)	1/11 (1)	n.s.
	ZFP36L1	Mutated, n (%)	0/45 (0)	0/34 (0)	0/11 (0)	n.s.

n.s., Not significant.

sequence [21/21 (100%) vs. 20/31 (65%) patients without *IGHV1-69*, $P < 0.002$]. The *NOTCH1* gene was mutated in 14/45 (31%) patients, who all harbored the recurrent p.P2515Rfs*4 mutation and *TP53* in 6/43 (14%) cases. No mutations were found in the *ZFP36L1* gene for the 45 patients tested (Table 2, Fig. 1, Supporting Information Table 2). A significant association was observed between *TP53* disruption (*TP53* mutated and/or

deleted) and *NOTCH1* mutations: *TP53*-disrupted/*NOTCH1*-mutated = 6/13 (46%) vs. *TP53*-disrupted/*NOTCH1*-unmutated = 4/30 (13%), $P = 0.04$. *NOTCH1* mutations were not significantly associated with trisomy 12, [*NOTCH1*-mutated/no-tri12: 8/32 (25%) vs. *NOTCH1*-mutated/tri12: 6/13 (46%) $P = 0.28$; Fig. 1].

Comparing SLL to CLL, even if trisomy 12 was more frequent in SLL and 13q14 deletion was less

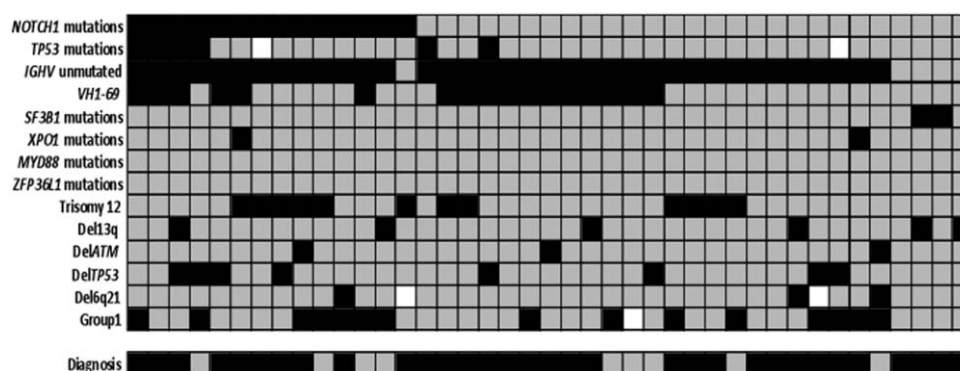


Figure 1. Distribution of cytogenetic and molecular alterations in 45 patients with 14q deletion. Columns represent individual patients, rows correspond to the mentioned alterations. Black boxes: presence; gray boxes: absence; and white boxes: lacking data. Diagnoses are indicated at the bottom: CLL in black, SLL in gray.

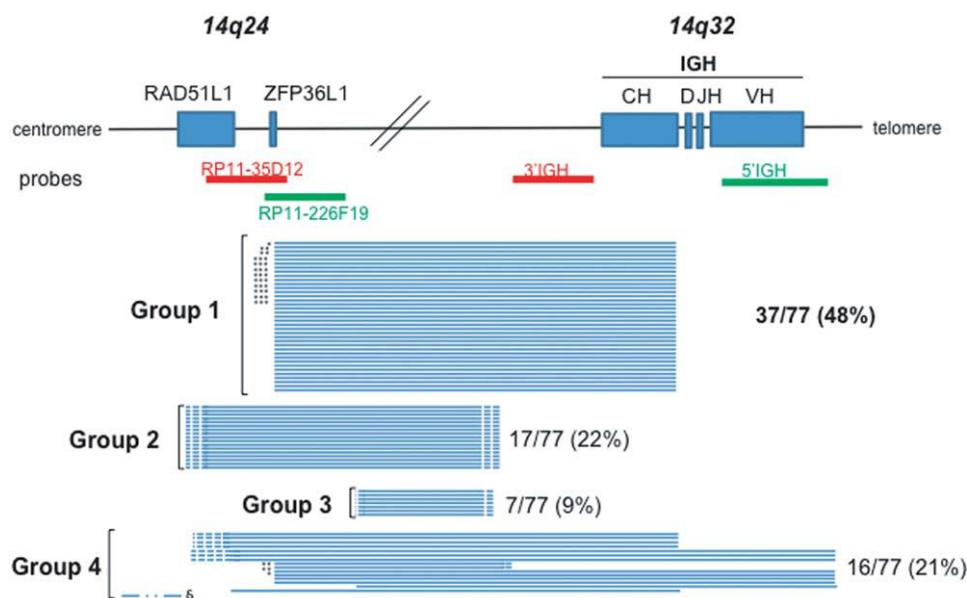


Figure 2. Analysis of the breakpoints of the 14q deletions. Location of the four probes used for the FISH analyses are indicated at the top. The 77 patients analyzed into four groups, according to the observed breakpoints. Group 1: breakpoints within *ZFP36L1* and *IGH*; Group 2: *ZFP36L1* deleted and *IGH* not deleted; Group 3: *ZFP36L1* and *IGH* not

deleted; and Group 4: other combinations. Breakpoint identified by SNP-array: *Telomeric to *ZFP36L1*, **intron1, and ***intron2 of *ZFP36L1*. §: del(14)(q24.1q24.2) centromeric to *ZFP36L1* identified by SNP-array. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

frequent in SLL, there was no statistically significant difference between any cytogenetic and molecular abnormalities (Table 2). In addition, no significant differences were found between CLL Matutes score 4–5 and CLL score 3 (data not shown).

We then compared the cytogenetic and molecular data from our CLL series with del(14q) with data from CLL in the literature (Supporting Information Table 5). Compared to the large series of untreated patients recently published by Rossi et al. (2013) CLL with a 14q deletion displayed a significantly higher frequency of trisomy 12 ($P < 0.03$) and a significantly lower frequency of del13q ($P < 0.0006$). The frequency of *NOTCH1* mutations was significantly higher in CLL with a del(14q) in our series than those observed in the series of (Weissmann et al., 2013) ($P < 0.003$). Compared to the *IGHV* sequences examined by (Agathangelidis et al., 2012), CLL with a del(14q) showed a significantly higher frequency of unmutated *IGHV* genes ($P < 0.00001$) and of the *IGHV1-69* repertoire ($P < 0.00001$). Regarding trisomy 12 and *IGHV* genes, compared to 17 unselected cases of SLL (Daudignon et al., 2010), patients with SLL and a 14q deletion also exhibited a higher frequency of unmutated *IGHV* genes ($P < 0.022$). There were also a higher *IGHV1-69* usage ($P = 0.056$) and more trisomy 12 ($P = 0.39$) in SLL cases with a 14q deletion, although this was not significant.

Characterization of the Breakpoints of the 14q Deletions

The 14q deletions detected by chromosome banding were distributed along chromosome 14 from bands q11 to q32. The centromeric and telomeric breakpoints of the 14q deletion were investigated by FISH or SNP-array when material was available (Fig. 2, Supporting Information Table 2 and Fig. 2).

Using FISH for 14q24.1, covered by the RP11-35D12 and RP11-226F19 probes, we observed the following categories among 77 patients:

1. In 44 (57%) patients, the breakpoint could be localized between the two probes, with the loss of one signal from the RP11-226F19 probe.
2. Twenty-three (30%) cases showed deletion of both probes, indicating that the breakpoint was centromeric to region 14q24.1.
3. In nine cases (12%), both probes were retained, suggesting that the breakpoint was telomeric to 14q24.1.
4. In one case, one isolated signal of the RP11-226F19 probe (with loss of RP11-35D12) and one isolated signal of the RP11-35D12 probe (with loss of RP11-226F19) were detected, which suggests that both chromosomes 14 were abnormal.

At the telomeric side (14q32.33), covered by the *IGH@* locus probe, different FISH patterns were observed for the 81 analyzed patients:

TABLE 3. Cytogenetic and Molecular Data from Groups Defined According to Centromeric and Telomeric 14q Breakpoints

		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	P-value
n (%)		37/77 (48)	17/77 (22)	7/77 (9)	16/77 (21)	
Diagnosis	CLL	26/37 (70)	10/17 (59)	6/7 (86)	10/16 (62.5)	n.s.
	SLL	11/37 (30)	7/17 (41)	1/7 (14)	6/16 (37.5)	
Karyotype	Complex, n (%)	16/37 (43)	4/16 (25)	0/7 (0)	4/15 (27)	n.s.
	Translocations, n (%)	14/37 (38)	4/16 (25)	0/7 (0)	7/15 (47)	n.s.
	Unbalanced translocations, n (%)	9/37 (24)	2/16 (12.5)	0/7 (0)	4/15 (27)	n.s.
Karyotype and/or FISH	Trisomy 12, n (%)	18/36 (50)	3/17 (18)	1/7 (14)	3/16 (19)	0.004
	13q deletion, n (%)	4/36 (11)	3/17 (18)	3/7 (43)	2/16 (12.5)	n.s.
	TP53 deletion, n (%)	6/36 (17)	2/17 (12)	0/7 (0)	2/16 (12.5)	n.s.
	ATM deletion, n (%)	2/36 (6)	2/17 (12)	1/7 (14)	0/16 (0)	n.s.
	6q21 deletion, n (%)	1/36 (3)	1/15 (7)	1/7 (14)	0/16 (0)	n.s.
	Number of chromosomal alterations, median (range)	2 (1–14)	2 (1–8)	1 (1–2)	2 (0–4)	n.s.
IGHV genes	Unmutated, n (%)	22/24 (92)	8/11 (73)	4/6 (67)	7/10 (70)	0.08
	VH1–69, n (%)	12/24 (50)	3/11 (27)	2/6 (33)	4/10 (40)	n.s.
NOTCH1	Mutated, n (%)	9/18 (50)	3/12 (25)	0/6 (0)	1/8 (12.5)	0.02
SF3B1	Mutated, n (%)	0/18 (0)	1/12 (8)	1/6 (17)	0/8 (0)	n.s.
XPO1	Mutated, n (%)	1/18 (6)	1/12 (8)	0/6 (0)	0/8 (0)	n.s.
TP53	Mutated, n (%)	4/16 (25)	1/12 (8)	0/6 (0)	1/7 (14)	n.s.

CLL: chronic lymphocytic leukemia; SLL: small lymphocytic lymphoma.

P-values correspond to statistical comparisons between Group 1 versus the other three groups (using Fisher's exact test). Statistically significant values are in bold.

1. Deletion detected with the 3'-flanking IGH@ probe in 45/81 (56%) cases.
2. No relevant deletion detected with either IGH@ probe in 27/81 (33%) cases.
3. Complete deletion of the IGH@ region in 9/81 (11%) cases.

Of note, in pattern 2, six cases had deletion or a diminution of the 5' flanking IGH@ probe, which could reflect physiological events accompanying VDJ assembly.

Using SNP-array, the size of the deletion in the long arm of chromosome 14 ranged from 37 to 68 megabases between chromosomal band 14q12 and 14q32.33 (Supporting Information Fig. 1). For 15 patients, with a breakpoint localized by FISH as being between the RP11-35D12 and RP11-226F19 probes, we precisely localized the breakpoint by SNP-array telomeric to *ZFP36L1* in two patients, within intron 1 in four patients, and within intron 2 in nine patients (UCSC genome browser, Build 37, hg19, NM-001244701; Fig. 2).

Characterization of Subgroups of Patients

Depending on the location of both centromeric and telomeric breakpoints, we identified four groups: Group 1: 37/77 (48%) patients with breakpoints within the *ZFP36L1* locus and within the IGH@ locus; Group 2: 17/77 (22%) with *ZFP36L1* deleted and IGH not deleted; Group 3: 7/77 (9%)

with *ZFP36L1* and IGH not deleted; and Group 4: 16/77 (21%) with other combinations. Group 1, the most common group, showed a deletion del(14)(q24.1q32.3) of about 38 megabases, which broke in or near the *ZFP36L1* gene and within the IGH@ locus (Fig. 2, Supporting Information Fig. 2). This occurred in 26 (70%) cases with a CLL score of 4–5 and in 11 (30%) SLL. In Group 1, trisomy 12 and *NOTCH1* mutations were significantly more frequent than in the remaining groups (trisomy 12: 18/36 [50%] vs. 7/40 [17.5%], $P = 0.004$; *NOTCH1* mutations: 9/18 [50%] vs. 4/26 [15.5%], $P = 0.02$). IGHV genes were unmutated in 22/24 (92%) patients in Group 1, and 12/24 (50%) harbored the gene *IGHV1-69* (Table 3).

The involvement of IGH@ in del(14)(q24.1q32.3) could suggest a transcriptional activation of an oncogene by juxtaposition to an enhancer of IGH@. This prompted us to quantify by quantitative RT-PCR the expression of 2 candidate genes located closed to the proximal breakpoint, *ZFP36L1* and *RAD51B*. In three patients from Group 1, the expression of these two genes was not higher than those observed in two patients with del(14q) included in other groups or in five CLL patients devoid of del(14q) (Supporting Information Fig. 3).

DISCUSSION

Deletion of 14q is not specific, and can be found in various acute and chronic hematologic diseases,

both lymphoid and myeloid (Mitelman et al., 2014). However, although this abnormality is recurrent in CLL, only a few studies have focused on 14q deletions in this disorder. Cytogenetic results are relevant in CLL to define the prognosis and to determine risk categories. Thus, we studied 81 patients with CLL and SLL and a 14q deletion, with SLL being the nonleukemic form of CLL (according to World Health Organization classification) (Jaffe, 2009). Indeed, we did not detect any significant statistical differences between the two disorders in our series, regarding cytogenetic and molecular data. This justifies studying CLL and SLL with 14q deletion as a whole entity.

Investigations using FISH and SNP-array demonstrate the heterogeneous size of the 14q deletions in our series, as previously described in the literature. We observed a breakpoint cluster at the centromeric site in 14q24.1 (57% of cases), and the most frequent breakpoint at the telomeric site was within the *IGH@* locus (14q32.3) (55.5% of cases). We identified a main group with a del(14)(q24.1q32.33), including 48% of our cases.

In the study by Pospisilova et al. (2007), 21/81 (26%) cases with B-NHL exhibited the same del(14)(q24.1q32.33), and 15/21 (72%) were CLL or immunophenotypically atypical CLL. All 16 patients (16/47 [34%] mature B-cell neoplasms) with del(14)(q24.1q32.33) reported by Reindl et al. (2010), were diagnosed as CLL. The higher proportion of del(14)(q24.1q32.33) found in our series may reflect a higher frequency of this recurrent deletion in CLL/SLL compared to other B-cell malignancies.

The finding of a breakpoint cluster for interstitial 14q deletions supports the hypothesis of upregulated expression of a gene in 14q24.1 juxtaposed with the enhancer of *IGH@*, similar to classical *IGH*-mediated translocations. However, we did not observe any altered expression of *ZFP36L1* and *RAD51B* genes in patients with the del(14)(q24.1q32.33). These results confirmed the transcriptomic studies performed by Pospisilova et al. (2007). Alternatively, microRNA(s) located in 14q24.1 may be targeted and upregulated (Chapiro et al., 2010).

Interstitial del(14q) might also cause haploinsufficiency of gene(s) or microRNA(s) located in the deleted region, or even cause the loss of both alleles of a putative tumor-suppressor gene. Of the 15 patients in whom we could precisely determine the breakpoint (using SNP-array) in 14q24.1, 13

had a breakpoint within the *ZFP36L1* gene. This is in accordance with the qPCR results of Pospisilova et al. (2007). *ZFP36L1* is a RNA-binding protein that interacts with AU-rich elements in the 3' untranslated region of mRNA, which leads to mRNA degradation and translational repression. Circumstantial evidence has linked the *ZFP36* family members to malignancy. Expression of *ZFP36* is suppressed in a variety of human malignancies. A tumor-suppressor role has been proposed to act through regulation of proliferative and antiapoptotic factors (Brennan et al., 2009). It has been shown in thymocytes that *ZFP36L1* interacts with evolutionarily conserved AU-rich elements in the 3' untranslated region of *NOTCH1* and suppresses its expression, thus preventing the development of T-cell acute lymphoblastic leukemia (Hodson et al., 2010). In patients displaying monoallelic disruption of *ZFP36L1*, it could be hypothesized that *ZFP36L1* acts as a tumor-suppressor gene and is inactivated by mutation in the other allele. However, we did not observe any mutation of *ZFP36L1* in these patients.

The 14q deletion may be the sole chromosomal abnormality or it will be associated with other aberrations. In a few cases (10.5%), a 14q deletion presented as a subclonal change, suggesting that at least in some cases, it may represent a secondary aberration. The most frequent additional chromosomal alteration in our series was trisomy 12, found in 35% of all patients, and in 50% of patients with recurrent del(14)(q24.1q32.3). Similarly, Pospisilova et al. (2007) reported a trisomy 12 in 8/18 (47%) patients with this particular del(14)(q24.1q32.3). Reindl et al. (2010) observed a trisomy 12 in 21/47 (45%) cases in an entire cohort of del(14q), and in 5/16 (35%) patients with the particular del(14)(q24.1q32.3). Trisomy 12 is also a frequent additional abnormality associated with other chromosomal changes that affect the *IGH@* locus, such as t(14;19) or t(14;18), suggesting cooperating oncogenic events (Martin-Subero et al., 2007; Chapiro et al., 2008; Nguyen-Khac et al., 2011).

The majority (77%) of patients with a del(14q) in our series expressed unmutated *IGHV* genes, particularly in Group 1 (92%), which was a higher rate than that observed in conventional series of CLL/SLL patients. Accordingly, a high frequency of unmutated cases was also observed in CLL with del(14q) in previous reports. Trisomy 12 has been reported to be associated with *IGHV4-39* stereotyped CLL (Athanasiadou et al., 2008; Rossi

et al., 2009). We only found 3/52 (6%) *IGHV4-39* in our series, with two harboring a trisomy 12. Strikingly, *IGHV1-69* accounted for 40% of the *IGH@* repertoire in our series, and for 50% in Group 1, which is remarkably higher than in common CLL/SLL (Agathangelidis et al., 2012). *IGHV1-69* has been reported to be predominant among unmutated *IGHV* (Murray et al., 2008). We have confirmed that all of our cases of *IGHV1-69* were unmutated. The high prevalence of *IGHV1-69* gene expression among CLL/SLL with del(14q) has not yet been reported, and strongly suggests that these cases may recognize similar antigenic structures.

To our knowledge, we are the first to report an association between del(14q) and *NOTCH1* mutations. *NOTCH1*-activating mutations were recently described to occur in ~10% of CLL patients, and were identified as an independent negative prognostic marker (Sportoletti et al., 2010; Fabbri et al., 2011; Puente et al., 2011). *NOTCH1* mutations have a higher prevalence in CLL with trisomy 12, particularly when this aberration is isolated (Del Giudice et al., 2012; Lopez et al., 2012). We found no association between *NOTCH1* mutations and trisomy 12 in our series. In contrast, we observed a high prevalence of *NOTCH1* mutations in CLL/SLL with del(14q), independently of trisomy 12.

There was also a significant association between *NOTCH1* mutations and *TP53* disruption, which is concordant with previous reports. Weissmann et al. (2013) observed a significant association between *NOTCH1*mut and *TP53*mut. *NOTCH1* mutations cluster with CLL and harbor unfavorable features, including *TP53* disruption, as described by Fabbri et al. (2011).

The median TFS was 27 months in our CLL cohort with del14q. Even if we are careful with clinical correlations in retrospective multicentric studies, we observed that del(14q) conferred a shorter TFS for patients with trisomy 12 compared to those without del(14q). These data are similar to those reported by Reindl et al. They observed a significantly shorter TFS in CLL with versus without del(14q), and the adverse effects of del(14q) remained when they analyzed the cohort of patients with trisomy 12 (Reindl et al., 2010). Chromosome 14q abnormalities, which are frequently associated with trisomy 12, such as a 14q deletion, t(14;18) or t(14;19), have a different clinical impact. Thus, it could be useful to systematically search for these abnormalities to improve risk categorization.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C Gabillaud for excellent technical assistance and E. Floc'h (Newmed Publishing Services) for the English revision of this manuscript.

REFERENCES

- Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Brochet X, Murray F, Yan XJ, Davis Z, van Gastel-Mol EJ, Tresoldi C, Chu CC, Cahill N, Giudicelli V, Tichy B, Pedersen LB, Foroni L, Bonello L, Janus A, Smedby K, Anagnostopoulos A, Merle-Beral H, Laoutaris N, Juliusson G, di Celle PF, Pospisilova S, Jurlander J, Geisler C, Tsaftaris A, Lefranc MP, Langerak AW, Oscier DG, Chiorazzi N, Belessi C, Davi F, Rosenquist R, Ghia P, Stamatopoulos K. 2012. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: A molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* 119:4467–4475.
- Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Gaitatzis M, Stavroyianni N, Fassas A, Anagnostopoulos A. 2008. Recurrent cytogenetic findings in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing IgG-switched stereotyped immunoglobulins. *Haematologica* 93:473–474.
- Beillard E, Pallisaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJ, Hokland P, Gabert J. 2003. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using “real-time” quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)—A Europe against cancer program. *Leukemia* 17:2474–2486.
- Brennan SE, Kuwano Y, Alkharouf N, Blackshear PJ, Gorospe M, Wilson GM. 2009. The mRNA-destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis. *Cancer Res* 69:5168–5176.
- Chapiro E, Radford-Weiss I, Bastard C, Luquet I, Lefebvre C, Callet-Bauchu E, Leroux D, Talmant P, Mozziconacci MJ, Mugneret F, Struski S, Raynaud S, Andrieux J, Barin C, Jotterand M, Mossafa H, Ramond S, Terre C, Lippert E, Berger F, Felman P, Merle-Beral H, Bernard OA, Davi F, Berger R, Nguyen-Khac F. 2008. The most frequent t(14;19)(q32;q13)-positive B-cell malignancy corresponds to an aggressive subgroup of atypical chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 22:2123–2127.
- Chapiro E, Russell LJ, Struski S, Cave H, Radford-Weiss I, Valle VD, Lachenaud J, Brousset P, Bernard OA, Harrison CJ, Nguyen-Khac F. 2010. A new recurrent translocation t(11;14)(q24;q32) involving IGH@ and miR-125b-1 in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 24:1362–1364.
- Daudignon A, Poulain S, Morel P, Penther D, Parmentier F, Bouchindhomme B, Fernandes J, Duthilleul P, Bastard C. 2010. Increased trisomy 12 frequency and a biased IgVH 3-21 gene usage characterize small lymphocytic lymphoma. *Leuk Res* 34:580–584.
- Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, Marinelli M, Tavaloro S, Gabrielli S, Laurenti L, Marasca R, Rasi S, Fangazio M, Guarini A, Gaidano G, Foa R. 2012. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica* 97:437–441.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. 2000. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 343:1910–1916.
- Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabanian H, Ma J, Grunn A, Fangazio M, Capello D, Monti S, Cresta S, Gargiulo E, Forconi F, Guarini A, Arcaini L, Paulli M, Laurenti L, Larocca LM, Marasca R, Gattei V, Oscier D, Bertoni F, Mullighan CG, Foa R, Pasqualucci L, Rabadan R, Dalla-Favera R, Gaidano G. 2011. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: Role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 208:1389–1401.
- Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stella S, Guida G, Michel A, Crespo M, Laoutaris N, Montserrat E, Anagnostopoulos A, Dighiero G, Fassas A, Caligaris-Cappio F,

- Davi F. 2005. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: The lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 105:1678–1685.
- Hodson DJ, Janas ML, Galloway A, Bell SE, Andrews S, Li CM, Pannell R, Siebel CW, MacDonald HR, De Keersmaecker K, Ferrando AA, Grutz G, Turner M. 2010. Deletion of the RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 leads to perturbed thymic development and T lymphoblastic leukemia. *Nat Immunol* 11:717–724.
- Jaffe ES. 2009. The 2008 WHO classification of lymphomas: Implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:523–531.
- Lopez C, Delgado J, Costa D, Conde L, Ghita G, Villamor N, Navarro A, Cazorla M, Gomez C, Arias A, Munoz C, Baumann T, Rozman M, Aymerich M, Colomer D, Cobo F, Campo E, Lopez-Guillermo A, Montserrat E, Carrio A. 2012. Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations. *Genes Chromosomes Cancer* 51:881–889.
- Martin-Subero JI, Ibbotson R, Klapper W, Michaux L, Callet-Bauchu E, Berger F, Calasanz MJ, De Wolf-Peters C, Dyer MJ, Felman P, Gardiner A, Gascoyne RD, Gesk S, Harder L, Horsman DE, Kneba M, Kuppers R, Majid A, Parry-Jones N, Ritgen M, Salido M, Sole F, Thiel G, Wacker HH, Oscier D, Wlodarska I, Siebert R. 2007. A comprehensive genetic and histopathologic analysis identifies two subgroups of B-cell malignancies carrying a t(14;19)(q32;q13) or variant BCL3-translocation. *Leukemia* 21:1532–1544.
- Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, Hallek M, Wendtner CM. 2006. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 107:742–751.
- Mitelman F, Johansson B and Mertens F, editors. 2014. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer Available at: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
- Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, Seon BK, Catovsky D. 1997. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 108:378–382.
- Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Tobin G, Boudjogra M, Scielzo C, Laoutaris N, Karlsson K, Baran-Marzszak F, Tsaftaris A, Moreno C, Anagnostopoulos A, Caligaris-Cappio F, Vaur D, Ouzounis C, Belessi C, Ghia P, Davi F, Rosenquist R, Stamatopoulos K. 2008. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: Implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 111:1524–1533.
- Nguyen-Khac F, Chapiro E, Lesty C, Grelier A, Luquet I, Radford-Weiss I, Lefebvre C, Fert-Ferrer S, Callet-Bauchu E, Lippert E, Raggueneau V, Michaux L, Barin C, Collonge-Rame MA, Mugneret F, Eclache V, Taviaux S, Dastugue N, Richebourg S, Struski S, Talmant P, Baranger L, Gachard N, Gervais C, Quilichini B, Settegrana C, Maloum K, Davi F, Merle-Beral H. 2011. Specific chromosomal IG translocations have different prognoses in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Blood Res* 1:13–21.
- Pospisilova H, Baens M, Michaux L, Stul M, Van Hummelen P, Van Loo P, Vermeesch J, Jarosova M, Zemanova Z, Michalova K, Van den Berghe I, Alexander HD, Hagemeijer A, Vandenbergh P, Cools J, De Wolf-Peters C, Marynen P, Wlodarska I. 2007. Interstitial del(14)(q) involving IGH: A novel recurrent aberration in B-NHL. *Leukemia* 21:2079–2083.
- Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Bea S, Gonzalez-Diaz M, Bassaganyas L, Baumann T, Juan M, Lopez-Guerra M, Colomer D, Tubio JM, Lopez C, Navarro A, Tornador C, Aymerich M, Rozman M, Hernandez JM, Puente DA, Freije JM, Velasco G, Gutierrez-Fernandez A, Costa D, Carrio A, Guijarro S, Enjuanes A, Hernandez L, Yague J, Nicolas P, Romeo-Casabona CM, Himmelbauer H, Castillo E, Dohm JC, de Sanjose S, Piris MA, de Alava E, San Miguel J, Royo R, Gelpi JL, Torrents D, Orozco M, Pisano DG, Valencia A, Guigo R, Bayes M, Heath S, Gut M, Klatt P, Marshall J, Raine K, Stebbings LA, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Gut I, Lopez-Guillermo A, Estivill X, Montserrat E, Lopez-Otin C, Campo E. 2011. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 475:101–105.
- Put N, Meeus P, Chatelain B, Rack K, Boeckx N, Nollet F, Graux C, Van Den Neste E, Janssens A, Madoe V, Van Hoof A, Bilhou-Nabera C, Wlodarska I, Vandenbergh P, Michaux L. 2009. Translocation t(14;18) is not associated with inferior outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 23:1201–1204.
- Reindl L, Bacher U, Dicker F, Alpermann T, Kern W, Schnittger S, Haferlach T, Haferlach C. 2010. Biological and clinical characterization of recurrent 14q deletions in CLL and other mature B-cell neoplasms. *Br J Haematol* 151:25–36.
- Romana SP, Cherif D, Le Coniat M, Derre J, Flexor MA, Berger R. 1993. In situ hybridization to interphase nuclei in acute leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 8:98–103.
- Rossi D, Spina V, Cerri M, Rasi S, Deambroggi C, De Paoli L, Laurenti L, Maffei R, Forconi F, Bertoni F, Zucca E, Agostinelli C, Cabras A, Lucioni M, Martini M, Magni M, Deaglio S, Ladetto M, Nomdedeu JF, Besson C, Ramponi A, Canzonieri V, Paulli M, Marasca R, Larocca LM, Carbone A, Pileri SA, Gattei V, Gaidano G. 2009. Stereotyped B-cell receptor is an independent risk factor of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Clin Cancer Res* 15:4415–4422.
- Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggin A, Monti S, Ciardullo C, Deambroggi C, Khiabani H, Serra R, Bertoni F, Forconi F, Laurenti L, Marasca R, Dal-Bo M, Rossi FM, Bulian P, Nomdedeu J, Del Poeta G, Gattei V, Pasqualucci L, Rabadan R, Foa R, Dalla-Favera R, Gaidano G. 2013. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 121:1403–1412.
- Sellmann L, Gesk S, Walter C, Ritgen M, Harder L, Martin-Subero JI, Schroers R, Siemer D, Nuckel H, Dyer MJ, Duhrsen U, Siebert R, Dürig J, Kuppers R. 2007. Trisomy 19 is associated with trisomy 12 and mutated IGHV genes in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 138:217–220.
- Sportoletti P, Baldoni S, Cavalli L, Del Papa B, Bonifacio E, Ciurnelli R, Bell AS, Di Tommaso A, Rosati E, Crescenzi B, Mecucci C, Screpanti I, Marconi P, Martelli MF, Di Ianni M, Falzetti F. 2010. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br J Haematol* 151:404–406.
- Tilly H, Bastard C, Halkin E, Lenormand B, Bizet M, Dauce JP, Lees O, Monconduit M, Piguet H. 1988. Del(14)(q22) in diffuse B-cell lymphocytic lymphoma. *Am J Clin Pathol* 89:109–113.
- Weissmann S, Roller A, Jeromin S, Hernandez M, Abaigar M, Hernandez-Rivas JM, Grossmann V, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S, Kohlmann A. 2013. Prognostic impact and landscape of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia (CLL): A study on 852 patients. *Leukemia* 27:2393–2396.

Supplemental Information

Material and Methods

SNP-array analyses

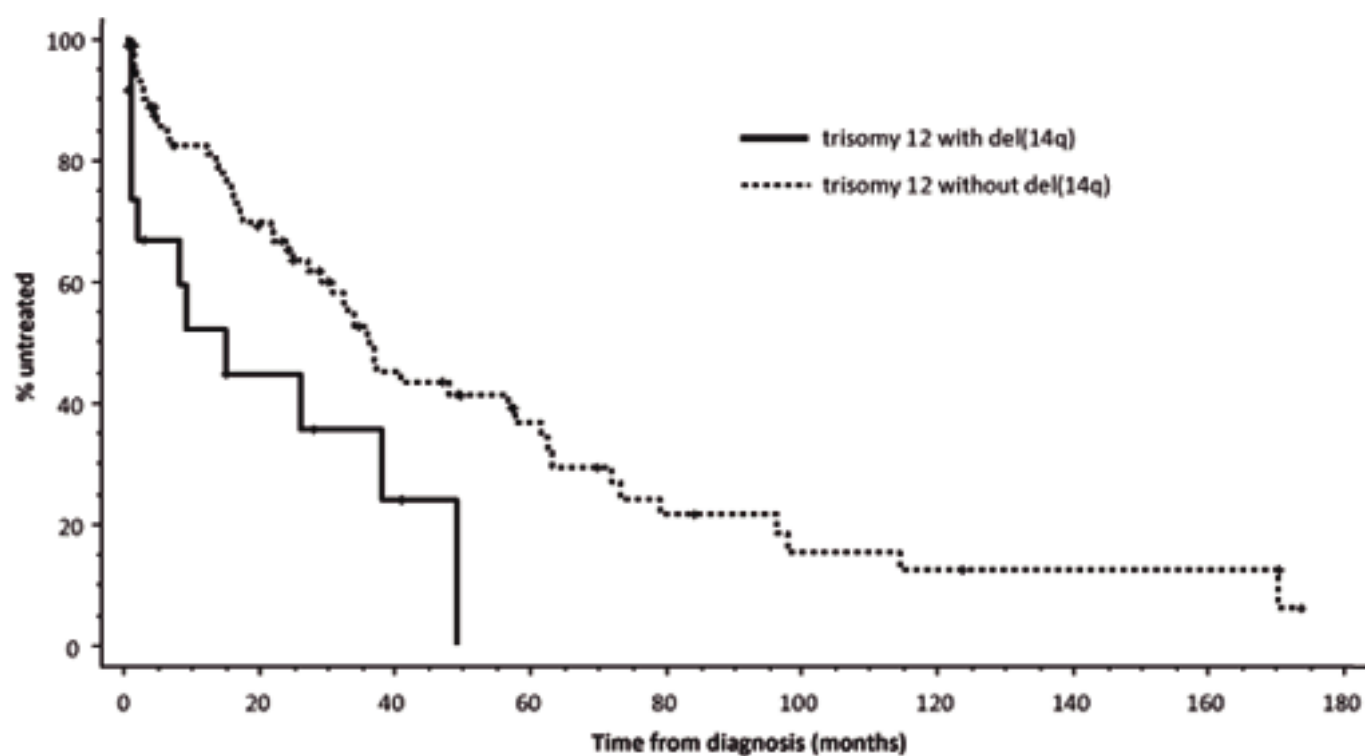
SNP profiles were analyzed by comparing the Log-R ratio, i.e., $\ln(\text{sample copy number/reference copy number})$, and the B-allele frequency (BAF). Reference standards were constructed with the cluster files provided by Illumina. The Log-R ratio can detect copy-number variations (CNV): a positive Log-R ratio indicates a gain in copy number whereas a negative Log-R ratio indicates a loss in copy number. The BAF indicates the genotype of each SNP: e.g., for an SNP with two copies, a BAF of 0 indicates an AA genotype, a BAF of 0.5 indicates an AB genotype, and a BAF of 1 indicates a BB genotype. The precision of breakpoints was + or –1 kb. Aberrant copy-number segments were cross-checked against the public Database of Genomic Variants (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation>) and visually inspected using GenomeStudio software: segments that were matched with a known variation and had an allele-B frequency compatible with a homogeneous copy-number alteration were considered to have constitutional copy-number polymorphisms and were excluded from our analyses.

Supplemental Figures Legends

Supplemental Figure 1. Kaplan-Meier estimates of treatment-free survival in CLL patients with a 14q deletion and/or trisomy 12. Patients with trisomy 12 without del(14q) were extracted from the Pitie-Salpetriere Hospital database.

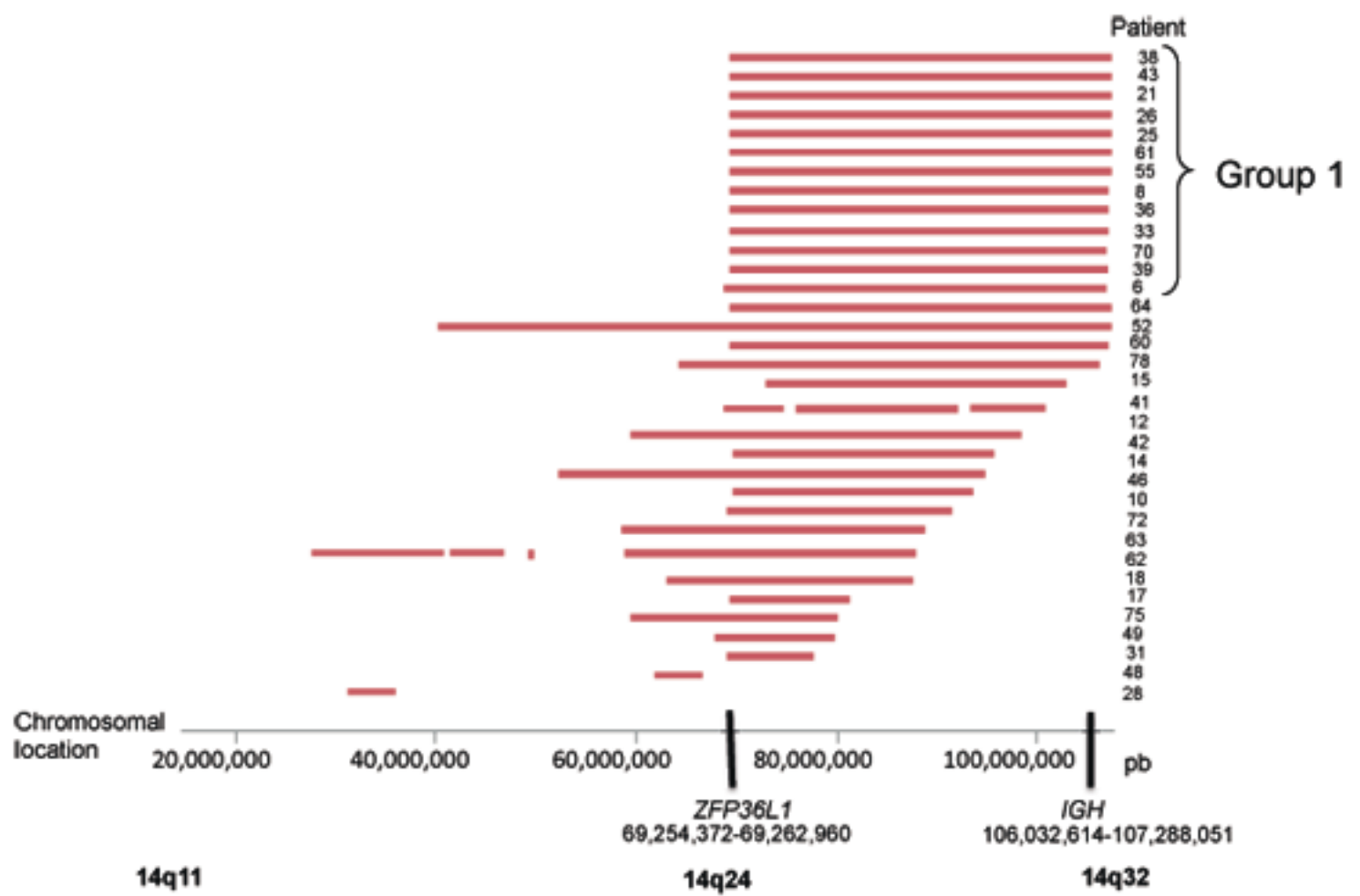
Supplemental Figure 2. Mapping of 14 deletions analyzed using SNP-array in 33 CLL/SLL patients

Supplemental Figure 3. Expression of *ZFP36L1* (A) and *RAD51B* (B) by real-time quantitative RT-PCR. Expression levels in 3 patients with del(14)(q24.1q32.33) from Group 1 (P20, P36, P44) were compared to expression in 2 patients with del(14q) from other groups (P62 from Group 2 and P52 from Group 4), 5 patients with CLL without del(14q), 2 samples of CD19+ cells and 1 sample of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors.

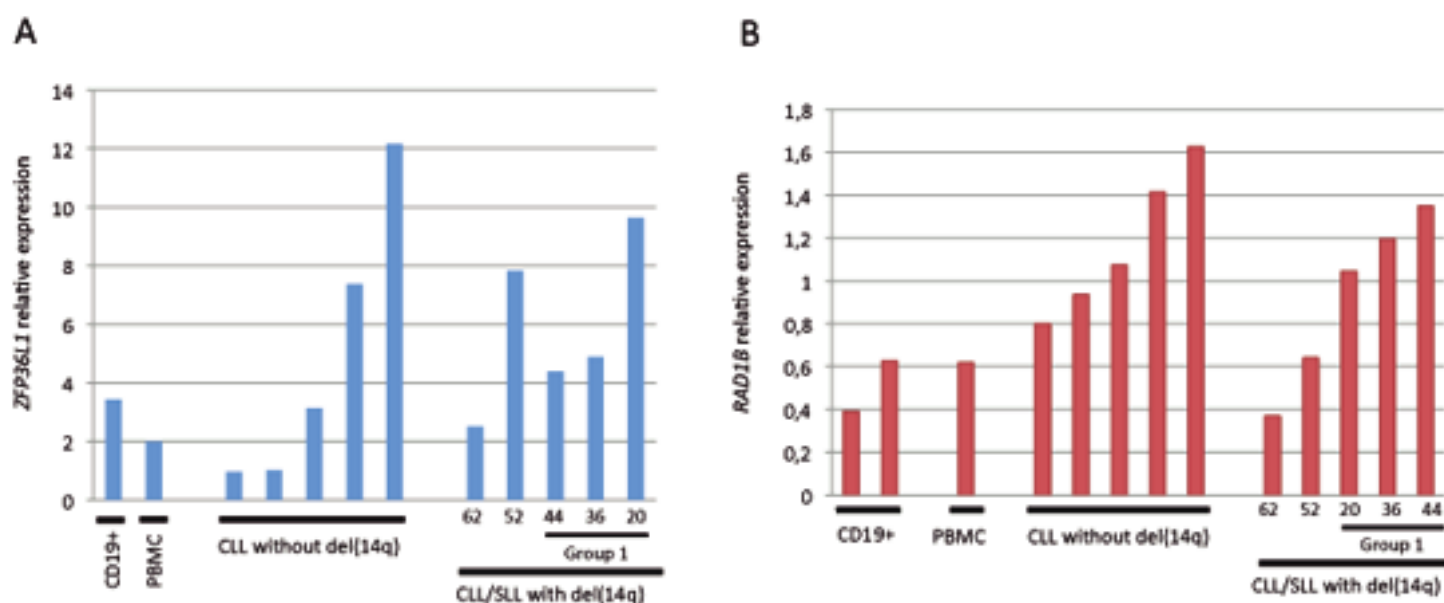


	number of patients	median (months)	95%CI	p-value
trisomy 12 with del(14q)	15	14	1-37	reference
trisomy 12 without del(14q)	72	36	27-57	<0.01

Supplemental Figure 1: Kaplan-Meier estimates of treatment: free survival in CLL patients with a 14q deletion and/or trisomy12. Patients with trisomy12 without del(14q) were extracted from the Pitie: Salpetriere Hospital database.



Supplemental Figure 2: Mapping of 14 deletions analyzed using SNP: array in 33 CLL/SLL patients



Supplemental Figure 3: Expression of *ZFP36L1* (A) and *RAD51B* (B) by real-time quantitative RT-PCR.

Expression levels in 3 patients with del(14)(q24.1q32.33) from Group 1 (P20, P36, P44) were compared to expression in 2 patients with del(14q) from other groups (P62 from Group 2 and P52 from Group 4), 5 patients with CLL without del(14q), 2 samples of CD19+ cells and 1 sample of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors.

Supplemental Table 1. Sequences of primers used for direct sequencing.

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
NOTCH1_ex34	ACAGCTACTCCTCGCCTGTG	AAGGCTTGGGAAAGGAAGC
SF3B1_ex12	TGGAAAATCTTCTTTGAGTAATTTG	TGCAAAGGAAAAGGTCTAGGA
SF3B1_ex13	TCAGTAATTGATGTGAAAGTGTAGC	CCATTTCTTTCCATAATCAATTCC
SF3B1_ex14	TTGATTATGGAAAGAAATGGTTGA	GGGCAACATAGTAAGACCCTGT
SF3B1_ex15-16	TTGGGGCATAGTTAAACCTG	TTCAAGAAAGCAGCCAAACC
		TGTTAGAACCATGAAACATATCCA
TP53_ex4	CCTGGTCCTCTGACTGCTCT	GCCAGGCATTGAAGTCTCAT
TP53_ex5-6	TTCCTCTTCCTGCAGTACTC	AGTTGCAAACCAGACCTCAG
TP53_ex7-8	AGGTTGGCTCTGACTGTACC	CTTGTCTGCTTGCTTACCTC
TP53_ex9	GGAGACCAAGGGTGCAGTTA	CCCCAATTGCAGGTAAAACA
TP53_ex10	CTTGAACCATCTTTTAACTCAGG	GGAATCCTATGGCTTTCCAA
XPO1_ex14	TCAAGTGAATGGTACAGAGTGG	TTTGCCTCTTTTCTGTTTACAT
XPO1ex_15	TGCAAGGGATAGGTATGAATTAG	TTCATTTATTTTGTCTCTGGACTC
		ATGGCATCACTTCTCCAACC
MYD88_ex5	GTTGTTAACCCTGGGGTTGAAG	GCAGAAGTACATGGACAGGCAGACAGATAC
ZFP36L1_ex1	GGACCTTCGCGACACAC	TGCCTTCCAAGACCCAAAC
ZFP36L1_ex2	CTGCCCATAGTGACATCCT	GGCACTTGTCCCCGTA CTTA
	AACTCCAGCCGCTACAAGAC	AGGCCAAAAGGGTTATTGGTG
	CTGCTGGACAGCCCCAC	GGAGAAGAGGGTATGGGATG

Supplemental Table 3. Observed copy number alterations (CNAs) and copy-neutral losses-of-heterozygosity (CN-LOH) for each case within the 36 analyzed patients. CNAs are listed for each case by providing start and stop positions referring to the UCSC Genome Browser; assembly February 2009, GRCh37/hg19 (<http://www.genome.ucsc.edu/>). CNAs not detected by karyotype and/or FISH analyses are highlighted in grey. Of note, X and Y abnormalities are not detected.

Patient	Type of array	Copy Number Alterations						CN-LOH
		Chromosome	Chromosomal band	Start	Stop	Segment length	CNA type	
6	omni 1	9	q33.2	123 579 520	124 043 867	464 347	loss	
		14	q24.1-q32.33	69 311 842	106 498 271	37 186 429	loss	
8	omni 2,5	5	p13.2	37 278 359	37 684 691	406 332	gain	
		14	q24.1-q32.33	69 261 472	107 287 663	38 026 191	loss	
10	omni 1	14	q24.1-q32.12	69 659 659	93 524 839	23 865 180	loss	
12	omni 1	14	q24.1-q24.3	68 842 160	74 697 769	5 855 609	loss	
		14	q24.3-q32.11	75 758 122	92 190 132	16 432 010	loss	
		14	q32.11-q32.2	93 290 962	100 688 997	7 398 035	loss	
		14	q32.33	106 326 733	107 175 296	848 563	loss	
		22	q11.22-q11.23	22 780 596	23 585 132	804 536	loss	
14	omni 2,5	11	q22.3	108 061 379	109 039 134	977 755	loss	
		14	q24.1-q32.13	69 704 553	95 575 414	25 870 861	loss	
15	omni 1	6	q23.2	133 675 770	134 225 835	550 065	gain	
		14	q23.2-q32.33	64 263 364	106 113 367	41 850 003	loss	
		22	q11.22	22 762 651	23 225 190	462 539	loss	
17	omni 2,5	8	p23.3-p11.22	163 226	38 821 665	38 658 439	loss	17p13.1-p11.1
		9	q21.11-q34.11	71 014 600	131 014 606	60 000 006	loss	
		11	q24.1	122 554 890	122 686 840	131 950	gain	
		14	q24.1-q31.1	69 261 472	81 418 088	12 156 616	loss	
		15	q15.1	40 192 918	42 326 259	2 133 341	loss	
18	omni 2,5	1	q41-q43	218 008 788	238 668 157	20 659 369	loss	
		14	q23.2-q31.3	62 925 574	87 596 098	24 670 524	loss	
20*	omni 1	2	q13	111 981 015	113 094 793	1 113 778	gain	
21	omni 2,5	6	q14.1-q14.3	76 532 237	86 566 463	10 034 226	loss	
		6	q21-q24.3	112 488 949	145 667 005	33 178 056	loss	
		14	q24.1-q32.33	69 261 472	107 287 663	38 026 191	loss	
		18	q22.3	69 127 977	69 257 360	129 383	loss	
25	omni 2,5	2	p25.3	14 238	1 283 031	1 268 793	loss	17p13.3-p11.1
		8	q21.3-q24.3	89 414 197	146 292 681	56 878 484	gain	
		9	p21.3	21 780 037	24 038 476	2 258 439	loss	
		9	p21.3-p21.2	24 278 743	27 591 803	3 313 060	loss	
		9	p21.1	28 778 418	33 034 665	4 256 247	loss	
		14	q24.1-q32.33	69 261 472	107 287 663	38 026 191	loss	
26	omni 2,5	5	q31.2-q34	137 426 447	165 010 625	27 584 178	loss	
		8	q11.23-q24.3	53 680 808	146 292 681	92 611 873	gain	
		9	p24.3-p23	185 632	12 703 484	12 517 852	gain	
		9	p21.1	28 918 559	32 181 573	3 263 014	loss	
		9	q21.12-q21.2	72 239 656	81 021 288	8 781 632	loss	
		11	p15.5	196 944	391 450	194 506	gain	
		13	q11-q34	19 168 981	115 103 529	95 934 548	loss	
		14	q24.1-q32.33	69 266 023	107 287 663	38 021 640	loss	
		17	p13.3-p11.1	2 220	22 242 355	22 240 135	loss	
		19	p13.3	260 912	4 007 080	3 746 168	loss	
		19	p13.2	7 466 835	7 933 770	466 935	gain	
		19	p13.2-p13.12	8 399 709	15 193 271	6 793 562	gain	
		19	p13.12-p13.11	15 193 271	18 273 410	3 080 139	gain	
		22	q12.1	27 036 505	29 406 609	2 370 104	loss	
		22	q13.31-q13.33	48 238 659	49 926 967	1 688 308	loss	
28	omni 2,5	13	q12.11	20 332 526	22 089 969	1 757 443	loss	

		14	q12-q13.2	31 187 379	35 901 490	4 714 111	loss	
		16	q24.2-q24.3	87 398 784	88 757 839	1 359 055	loss	
31	omni 2,5	10	q24.2-q25.1	101 474 368	105 840 422	4 366 054	loss	
		14	q24.1-q24.3	68 915 416	77 559 321	8 643 905	loss	
		17	p13.3-p11.2	2 220	18 804 217	18 801 997	loss	
33	omni 2,5	12	pter-qter	183 923	133 777 645	133 593 722	gain	
		14	q24.1-q32.33	69 259 662	107 126 729	37 867 067	loss	
36	omni 2,5	12	pter-qter	208 838	133 766 122	133 557 284	gain	
		14	q24.1-q32.33	69 261 472	107 142 448	37 880 976	loss	
38	omni 2,5	12	pter-qter	163 819	133 779 375	133 615 556	gain	
		14	q24.1	69 078 074	69 148 127	70 053	loss	
		14	q24.1-q32.33	69 266 023	107 287 663	38 021 640	loss	
		17	q25.3	79 964 474	80 853 177	888 703	loss	
39	omni 1	11	p12	41 346 363	42 239 022	892 659	loss	
		12	pter-qter	19 799	137 278 626	137 258 827	gain	
		14	q24.1-q32.33	69 259 502	106 631 735	37 372 233	loss	
41	omni 2,5	1	p36.11	26 242 882	27 004 590	761 708	loss	
		3	p21.31	45 611 965	50 123 417	4 511 452	loss	
		3	p21.2-p21.1	51 409 600	53 385 418	1 975 818	loss	
		6	q15-q22.1	90 739 581	116 314 634	25 575 053	loss	
		13	q13.3-q22.1	35 980 006	73 854 666	37 874 660	loss	
		14	q24.2-q32.32	72 806 744	102 763 731	29 956 987	loss	
42	omni 1	3	p26.3-p25.3	66 894	10 368 113	10 301 219	loss	
		14	q23.1-q32.2	59 469 737	98 486 406	39 016 669	loss	
		18	q21.1-q23	46 252 815	77 936 214	31 683 399	gain	
43	omni 2,5	3	q26.1-q29	164 764 719	197 854 435	33 089 716	gain	
		5	q14.1	80 501 981	80 597 767	95 786	gain	
		7	q34	142 105 601	142 531 233	425 632	loss	
		12	pter-qter	163 819	133 779 375	133 615 556	gain	
		14	q24.1-q32.33	69 261 472	107 287 663	38 026 191	loss	
44	omni 1	4	p16.3-p14	2 571	39 329 102	39 326 531	loss	
		4	q13.1	61 754 897	63 257 642	1 502 745	loss	
		7	q34	141 738 982	142 532 332	793 350	loss	
		12	pter-qter	163 819	133 779 375	133 615 556	gain	
		17	q21.31-q21.32	43 581 752	44 124 451	542 699	loss **	
46	omni 2,5	7	p21.1-p13	19 730 538	44 028 186	24 297 648	loss	
		13	q14.2-q14.3	50 570 191	51 427 173	856 982	loss **	13q11-q34
		14	q22.1-q32.12	52 250 365	94 682 787	42 432 422	loss	
48#	omni 1	13	q14.2-q14.3	48 414 487	51 612 656	3 198 169	loss	
		14	q23.1-q23.3	61 853 796	66 450 692	4 596 896	loss	
49§	omni 1	1	p31.1	72 587 371	75 711 144	3 123 773	loss	
		2	q34-q37.1	216 106 792	231 896 979	15 790 187	loss	
		4	q31.3	153 597 771	155 187 064	1 589 293	loss	
		5	q34	163 264 549	163 951 817	687 268	loss	
		6	p25.3-p25.1	100 815	6 179 882	6 079 067	gain	
		6	p25.1-p23	6 198 195	13 489 400	7 291 205	loss	
		6	p23	13 559 802	14 056 248	496 446	gain	
		6	p23-p21.2	14 198 772	39 811 883	25 613 111	loss	
		6	p21.2-p12.1	39 942 114	57 230 422	17 288 308	gain	
		8	p23.3-p11.21	644 824	40 401 035	39 756 211	loss	
		13	q12.11-q12.12	20 524 705	24 077 044	3 552 339	loss	
		14	q24.1-q24.3	67 882 034	79 665 047	11 783 013	loss	
		17	p13.3-p11.2	13 905	22 260 674	22 246 769	loss	
		21	q11.2-q21.1	15 311 828	19 999 399	4 687 571	gain	
		21	q21.1-q22.3	22 663 747	46 942 324	24 278 577	gain	
52	omni 2,5	12	pter-qter	163 819	133 779 375	133 615 556	gain	
		14	q24.1-q32.33	69 261 472	107 287 663	38 026 191	loss	
55	omni 2,5	14	q24.1-q32.33	69 259 042	107 287 663	38 028 621	loss	
		17	p12	14 083 038	15 482 817	1 399 779	loss	
60	omni 2,5	14	q21.1-q32.33	40 255 505	107 287 663	67 032 158	loss	19q13.41-q13.41
		21	q21.1	16 440 190	16 480 729	40 539	gain	

61	omni 2,5	14	q24.1-q32.33	69 261 472	107 287 663	38 026 191	loss
62	omni 2,5	14	q12-q21.1	27 730 020	40 651 595	12 921 575	loss
		14	q21.1-q21.2	41 350 899	46 730 763	5 379 864	loss
		14	q21.3	49 349 224	49 742 926	393 702	loss
		14	q23.1-q31.3	58 823 033	87 957 945	29 134 912	loss
63	omni 2,5	2	q36.1-q36.2	225 167 072	225 539 718	372 646	gain
		6	q15-q22.33	91 580 571	130 055 734	38 475 163	loss
		11	q22.3-q23.3	105 581 200	114 928 727	9 347 527	loss
		14	q23.1-q31.3	58 404 805	88 684 512	30 279 707	loss
64	omni 2,5	2	q12.2	106 391 338	106 627 281	235 943	loss
		12	p13.2	11 761 718	12 244 301	482 583	loss
		12	p13.1-p12.3	14 381 927	14 838 469	456 542	loss
		12	p12.3	15 659 024	15 753 830	94 806	loss
		12	q23.3	104 351 135	105 619 089	1 267 954	loss
		12	q23.3-q24.11	108 931 779	109 803 249	871 470	loss
		12	q24.13	113 480 510	113 561 318	80 808	loss
		14	q24.2-q32.33	68 749 927	107 287 663	38 537 736	loss
70	omni 2,5	18	q12.3	38 339 379	38 439 289	99 910	gain
		3	p26.3-p12.1	61 044	86 385 842	86 324 798	loss
		4	p16.1	6 679 768	6 909 807	230 039	loss
		4	p15.2-p15.1	26 518 865	29 761 008	3 242 143	loss
		4	p15.1-p14	31 025 354	36 340 891	5 315 537	loss
		4	p12	44 859 443	55 752 570	10 893 127	loss
		4	q12	57 035 046	57 345 195	310 149	loss
		4	q12	57 636 878	58 561 295	924 417	loss
		4	q13.3	72 065 242	72 739 098	673 856	loss
		4	q13.3	75 792 113	75 899 133	107 020	loss
		4	q21.1	78 413 360	78 618 910	205 550	loss
		4	q21.21-q22.1	80 586 665	90 034 686	9 448 021	loss
		4	q22.1	90 118 117	91 355 882	1 237 765	loss
		4	q22.1-q24	91 482 314	101 156 513	9 674 199	loss
		6	p22.3	16 314 375	16 966 702	652 327	loss
		14	q24.1-q32.33	69 261 472	107 073 718	37 812 246	loss
		15	q11.1-q15.3	20 005 287	43 824 894	23 819 607	loss
		17	p13.3-p11.1	2 220	22 252 439	22 250 219	loss
72	omni 2,5	12	pter-qter	163 819	133 779 375	133 615 556	gain
		14	q24.1-q32.11	68 997 635	91 566 947	22 569 312	loss
75	omni 2,5	13	q32.1-q34	97 423 170	115 100 470	17 677 300	loss
		14	q23.1-q31.1	59 336 116	79 997 085	20 660 969	loss
		18	q21.33-q23	59 974 497	78 015 057	18 040 560	gain
78	omni 1	14	q24.1-q32.33	69 288 432	107 187 462	37 899 030	loss
		22	q11.22	22 552 919	23 153 462	600 543	loss

* 14q deletion not detected by SNP-array. Using FISH, the deletion was present in only 2% of cells.

Normal karyotype. 14q deletion detected by SNP-array, confirmed by FISH analyses.

§ Karyotype not done. 14q deletion detected by SNP-array, confirmed by FISH analyses. TP53 deletion also detected by FISH.

** log ratios indicate biallelic losses

Supplemental Table 4. Recurrent copy-number alterations observed by SNP-arrays in at least two patients among the 36 analyzed. The 14q deletions were not included.

Chromosome	Chromosomal band	Start	Stop	Segment length	CNA type	Number of cases
3	p26.3-p25.3	66 894	10 368 113	10 301 219	loss	2
3	p21.31	45 611 965	50 123 417	4 511 452	loss	2
3	p21.2-p21.1	51 409 600	53 385 418	1 975 818	loss	2
4	p16.1	6 679 768	6 909 807	230 039	loss	2
4	p15.2-p15.1	26 518 865	29 761 008	3 242 143	loss	2
4	p15.1-p14	31 025 354	36 340 891	5 315 537	loss	2
5	q34	163 264 549	163 951 817	687 268	loss	2
6	p22.3	16 314 375	16 966 702	652 327	loss	2
6	q21-q22.1	112 488 949	116 314 634	3 825 685	loss	3
7	q34	142 105 601	142 531 233	425 632	loss	2
8	p23.3-p11.22	644 824	38 821 665	38 176 841	loss	2
8	8q21.3-qter	89 414 197	146 292 681	56 878 484	gain	2
9	p21.1	28 918 559	32 181 573	3 263 014	loss	2
9	q21.12-q21.2	72 239 656	81 021 288	8 781 632	loss	2
9	q33.2	123 579 520	124 043 867	464 347	loss	2
11	q22.3	108 061 379	109 039 134	977 755	loss	2
12	pter-qter	19 799	137 278 626	137 258 827	gain	8
13	q14.2-q14.3	50 570 191	51 427 173	856 982	loss	4
13	q12.11	20 332 526	22 089 969	1 757 443	loss	3
15	q15.1	40 192 918	42 326 259	2 133 341	loss	2
17	p13.3-p11.2	13 905	22 260 674	22 246 769	loss	4
18	q21.33-qter	59 974 497	77 936 214	17 961 717	gain	2
21	q21.1	16 440 190	16 480 729	40 539	gain	2
22	q11.22	22 780 596	23 153 462	372 866	loss	3

Supplemental Table 5. Comparison with the literature of cytogenetic and molecular data of chronic lymphocytic leukemia (CLL) and small lymphocytic lymphoma (SLL) with 14q deletions.

	CLL			SLL		
	Present study, <i>n</i> (%)	Common CLL, <i>n</i> (%)	<i>p</i> value	Present study, <i>n</i> (%)	Unselected SLL ^d , <i>n</i> (%)	<i>p</i> -value
13q deletion	11/53 (21)	286/637 (45) ^a	<0.0006			
Trisomy 12	15/53 (28)	105/637 (16.5) ^a	<0.03	13/26 (50)	8/22 (36)	0.39
11q deletion	4/53 (7.5)	46/637 (7.2) ^a	0.79			
17p deletion	8/54 (15)	62/637 (10) ^a	0.24	3/26 (11.5)	1/22 (4.5)	0.61
<i>IGHV</i> unmutated	31/41 (76)	3425/7596 (45) ^b	<0.00001	10/12 (83)	6/17 (35)	0.022
<i>VH1-69</i> gene	16/40 (40)	973/7596 (13) ^b	<0.00001	5/12 (42)	1/17 (6)	0.056
<i>NOTCH1</i> mutated	10/34 (30)	103/852 (12) ^c	<0.003			

References:

- a. Rossi D, Rasi S, Spina V, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;121:1403-1412.
- b. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* 2012;119:4467-4475.
- c. Weissmann S, Roller A, Jeromin S, et al. Prognostic impact and landscape of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a study on 852 patients. *Leukemia* 2013.
- d. Daudignon A, Poulain S, Morel P, et al. Increased trisomy 12 frequency and a biased IgVH 3-21 gene usage characterize small lymphocytic lymphoma. *Leukemia Res* 2010;34:580-584.



III. Article 3 – The gain of the short arm of chromosome 2 (2p+) induces *XPO1* overexpression and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia

Article soumis

Le gain du bras court du chromosome 2 (2p) est observé dans 2 à 28% des cas de LLC, selon les séries, incluant notre première étude. Les régions minimales de gain comprises entre les bandes 2p13 à 2p25, diffèrent d'une série à l'autre, et aucun gène candidat n'a clairement été identifié à ce jour. Nous avons délimité une région minimale de gain incluant le gène *XPO1*, gène par ailleurs retrouvé muté de façon récurrente dans la LLC, et nous avons regardé la réponse aux traitements des LLC soit avec un gain 2p, soit avec *XPO1* muté, incluant les drogues classiques et le nouvel inhibiteur spécifique **Selinexor/KPT-330** actuellement en phase I/II dans plusieurs essais cliniques.

Pour notre étude *in vitro* nous avons analysé une cohorte de 36 LLC 2p+. Un séquençage par Sanger du « hotspot » de mutation de *XPO1* a été réalisé sur 436 LLC. L'analyse de la MCP induite par les différentes drogues a été effectuée par cytométrie (marquage Annexine-V/iodure de propidium).

Les analyses clinico-biologiques des LLC 2p+ en comparaison des LLC 2p- incluses dans un protocole clinique ont montré que le gain 2p était associé de façon significative à des facteurs de mauvais pronostic (del(11q), statut non-muté *IGHV*). Les analyses par FISH ont confirmé que toutes les LLC 2p+ analysées avaient bien une copie additionnelle de *XPO1*, dans des pourcentages variables, le gain de *XPO1* étant souvent sous-clonal. Des analyses longitudinales montraient que, lors des rechutes, le clone avec gain *XPO1* restait soit dans des proportions similaires, soit augmentait.

Nos résultats par ailleurs indiquent que : (i) 23/436 (5.3%) LLC présentent *XPO1* muté (6,7% parmi les LLC 2p+). (ii) Le traitement avec Selinexor (24 h) induit la MCP des cellules de LLC 2p-/*XPO1*wt. (iii) Le Selinexor induit une mort de type apoptose caspase-dépendante, impliquant la mitochondrie et la surexpression ainsi que l'activation de la protéine pro-apoptotique Bax. (iv) A noter que l'induction de MCP avec Selinexor est similaire dans toutes les LLC testées, de bon ou mauvais pronostique (del(13q), tri12, del*ATM*, del*TP53*). En revanche, les cellules B de donneurs sains et les cellules non leucémiques (CD19-) de patients LLC sont insensibles au Selinexor. (v) Les cellules LLC *XPO1*muté montrent une résistance significative à l'induction de MCP avec Selinexor, mais restent

sensibles aux traitements RFC (Rituximab-Fludarabine-Cyclophosphamide) ou Ibrutinib. (vi) Les LLC 2p+ sont résistantes à la MCP induite par KPT-330, RFC, Ibrutinib et R-Idelalisib (Rituximab-Idelalisib).

L'ensemble de nos résultats montre que l'inhibition de XPO1 par Selinexor induit la MCP des cellules de LLC, mais est sans effet sur les cellules B non-tumorales. Ces résultats suggèrent que XPO1 joue un rôle important dans la survie des cellules B de LLC. Nos études indiquent également que le gain 2p entraîne une résistance aux traitements RFC, Ibrutinib, R-Idelalisib et Selinexor. Comme suite à ce travail nous proposons d'inclure la recherche du gain 2p et de la mutation *XPO1* dans le bilan pré-thérapeutique des patients atteints de LLC.

Discussion

Notre étude a permis de confirmer que le gain 2p est une anomalie récurrente dans la LLC. En effet, nous avons identifié 15,9% de patients LLC avec un gain 2p dans une cohorte de patients LLC stades Binet B/C non préalablement traités et inclus dans un essai clinique. Nous avons également trouvé cette anomalie associée à des facteurs de mauvais pronostic, comme le statut non-muté des *IGHV* et la délétion 11q^{64,68}.

Nous avons identifié deux régions minimales gagnées par SNP-array, comportant, outre *XPO1*, *BCL11A* et *REL* qui sont des oncogènes déjà connus dans la LLC, et qui pourraient également jouer un rôle important dans le gain 2p. De manière générale, les gènes localisés dans les régions gagnées sont en trois copies ou plus, au lieu des deux normalement présentes. Selon les modèles déjà connus en oncogenèse, ces gains peuvent avoir deux types de conséquences biologiques prévisibles : (i) le gène peut être sauvage et sa transcription augmentée, entraînant une activité normale, mais plus importante ; (ii) le gène peut être muté, et le gain d'une copie intensifie l'effet de la mutation.

Le Selinexor induit *in vitro* l'apoptose des cellules de LLC indépendamment de la présence de facteurs de bon ou de mauvais pronostic, comme la présence de la délétion 13q isolée, la del(11q), la tri12, la del(17p), ou encore en fonction du statut muté ou non-muté pour les *IGHV*. Plus encore, le traitement avec le Selinexor de lymphocytes B de donneurs sains ou de cellules CD19- de patients LLC (fraction non-tumorale) n'a aucun effet sur la mort de ces cellules. Ce traitement semble donc très intéressant dans le traitement de la LLC. Notre étude révèle des résistances possibles au Selinexor, qui sont le gain 2p (gain *XPO1*) et les mutations de *XPO1* muté, anomalies qui semblent importantes à rechercher avant toute mise en route du traitement, afin d'éviter la sélection de (sous-)clones plus agressifs.

The gain of the short arm of chromosome 2 (2p+) induces *XPO1* overexpression and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia

Adrien Cosson^{1,2,3}, Elise Chapiro^{1,2,4}, Jérôme Lambert⁵, Hong-Anh Cung⁴, Caroline Algrin⁴, B Keren⁶, Frédéric Damm⁷, Clémentine Gabillaud⁴, Frédéric Davi^{1,2,4}, Hélène Merle-Béral^{1,2,4}, D Roos-Weil⁷, Sylvain Choquet⁴, Madalina Uzunov⁴, Véronique Morel⁴, Véronique Leblond⁴, Karim Maloum⁴, Stéphane Leprêtre⁸, Pierre Feugier⁹, Claude Lesty⁴, Julie Lejeune⁵, Laurent Sutton¹⁰, Yosef Landesman¹¹, Santos A. Susin^{1,2,3*}, and Florence Nguyen-Khac^{1,2,4*}

¹INSERM UMR_S 1138, Cell Death and Drug Resistance in Lymphoproliferative Disorders Team, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France.

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France.

³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR_S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

⁴GH Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

⁵Hôpital Saint Louis, Paris, France.

⁶Département de génétique, GH Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

⁷INSERM U1170, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France.

⁸Hôpital Becquerel, Rouen, France.

⁹Hôpital Brabois, Vandoeuvre-les-Nancy, France.

¹⁰Hôpital d'Argenteuil, Argenteuil, France.

¹¹Karyopharm Therapeutics, Newton, MA, USA.

*Senior coauthorship

Correspondence:

Florence Nguyen-Khac, MD, PhD, Full Professor
Department of Hematology. Hospital Pitié-Salpêtrière UPMC Paris 6, 83 Bd de l'Hôpital, 75013Paris
Phone: +33142162451
Fax: +33142162453
E-mail: florence.nguyen-khac@psl.aphp.fr

Santos A Susin, PhD, Research Director

Centre de Recherche des Cordeliers, UPMC Paris 6, 15 rue de l'école de médecine,
75006Paris
Phone : +33144279070
Fax : +33144279036
E-mail: santos.susin@crc.jussieu.fr

Scientific category: lymphoid neoplasia

Text: 1209 words

Abstract: 195 words

Short title: 2p gain and deregulated XPO1 induce resistance

Key Points:

- 2p gain induces XPO1 overexpression and drug resistance to classical in CLL
- XPO1 overexpression and XPO1 mutations induce Selinexor resistance

Abstract

The gain of the short arm of chromosome 2 (2p+) is a recurrent aberration associated to poor prognosis and adverse prognostic factors, such as 11q deletion or unmutated *IGHV* in chronic lymphocytic leukemia (CLL). To analyze the therapeutic consequences of the 2p+ in CLL, we have performed a comparative analysis that uncovers a minimally 2p-gained region of 1.28 Mb encompassing *XPO1*, which is a gene overexpressed in 2p+ patients, and also recurrently mutated in CLL. A longitudinal analysis of CLL-treated patients, revealing a selection of malignant clones with *XPO1* gain, strongly supports the relevance of *XPO1* in CLL drug resistance. This has been corroborated by *in vitro* studies, performed in a cohort of primary CLL B-cells, showing that the 2p gain confers resistance to the tri-therapy Fludarabine-Cyclophosphamide-Rituximab (FCR), Ibrutinib, Rituximab-Idelalisib (R-Idelalisib). Our results also reveal that, in contrast to CLL B-cells with poor prognostic factors (unmutated *IGHV* or dysfunctional *TP53*), both 2p+ and the mutations in the binding domain of *XPO1* (amino acid E571) induce resistance to Selinexor (KPT-330), a specific *XPO1* inhibitor. Altogether, our results indicate that 2p+ and the mutations in *XPO1* influence the response of the malignant CLL B-lymphocytes to anti-CLL treatments.

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most common adulthood leukemia, is characterized by an accumulation of abnormal CD5⁺ B-lymphocytes in the peripheral blood, bone marrow, and secondary lymphoid organs. Acquired genetic mutations play an important role in CLL pathogenesis and massive parallel sequencing has allowed the identification of mutated genes, such as *NOTCH1*, *S3FB1*, *XPO1*, *EGR2*, and *NFKBIE* mutations.^{1–4} The most frequent chromosomal abnormalities are deletions on 11q, 13q and 17p, gain of chromosome 12, and gain of the short arm of chromosome 2 (2p+).^{5,6} Altogether, the high diversity of cytogenetic and genomic abnormalities partly explain both the clinical heterogeneity of CLL and the drug resistance characterizing this disease. Identifying the deregulation of new genes in CLL is therefore important to improve our understanding about CLL development and evolution, and to propose new targeted strategies.

We have previously demonstrated that 2p+ is associated to poor CLL prognosis and adverse prognostic factors, such as 11q deletion or unmutated *IGHV*.⁷ *MYCN*, *REL*, *BCL11A*, and *MSH2* have been suggested as candidate disease genes involved in the 2p gain, but their role in the pathogenesis of CLL is not established.^{7–10} In this manuscript, we identified a minimal region gained in 2p+/CLL patients and demonstrated that *CRM1/XPO1* (*Exportin-1*) is located in this region and recurrently mutated in CLL. Then, we evaluated the response of 2p+ and *XPO1*-mutated CLL cells to commonly used anti-CLL drugs, including the tri-therapy FCR, Ibrutinib, R-Idelalisib, and the newly described *XPO1* inhibitor Selinexor.

Methods

The procedures in our manuscript followed the Helsinki Declaration and the recommendations of the ethical committee on human experimentation at Pitié-Salpêtrière Hospital. We have sequenced the *XPO1* gene in 329 previously untreated patients (Binet stages B/C) included in two prospective trials,^{11,12} and 107 untreated CLLs from the biobank of Pitié-Salpêtrière Hospital. Separately, we have identified 36 CLL, also investigated for *XPO1* mutations, with 2p+ by a cytogenetic approach. The characteristics of our series of 36 2p+/CLL (included or not in a trial) are reported in Supplementary Table S1 and Supplementary Figure S1.

Flow Cytometry experiments were performed as previously described.¹³ To induce programmed cell death (PCD), CLL cells were treated for 24 h with KPT-301 (250 nM), Selinexor (KPT-330) (250 nM), Ibrutinib (15 μ M), Fludarabine (35 μ M), Idelalisib (50 μ M) (Selleckchem), Rituximab (Roche, 10 μ g/mL), Cyclophosphamide (Sigma Aldrich, 5 mM). For the caspase inhibition assay, Q-VD-Oph (10uM) was added 30 min before inducing PCD. Genetics, biochemical and statistical methods are detailed in Supplementary Methods.

Results and Discussion

To identify a candidate disease gene involved in the 2p gain, we used a genomic approach in 132 CLL samples included in a clinical trial for chromosome 2 abnormalities.¹¹ Twenty-one (16%) showed a 2p+ that was significantly associated with del(11q) and unmutated *IGHV*, confirming the high frequency of 2p+ and its association with poor prognostic factors (Supplementary Table S2).^{9,7,10,14,15} Although not significant, the median overall survival (OS) of patients with 2p+/CLL was shorter than that of patients without 2p gain. We next narrowed down the gained chromosome 2 regions by using SNP-array on 23 samples (Figure 1A). Although most patients showed large 2p gains, we identified two minimally gained regions based on one sample each: a 674 kb region containing one single gene (TTC27), and a 1.28 Mb region harboring 10 genes (*BCL11A*, *PAPOLG*, *REL*, *PUS10*, *PEX13*, *KIAA1841*, *C2orf74*, *AHSA2*, *USP34*, and *XPO1*). Since *XPO1* is recurrently mutated in CLL and its overexpression is associated with poor prognosis and resistance to therapy in various cancers,¹⁶ we focused our analyses on this particular gene. First, using a FISH approach, we fully confirmed the gain of *XPO1* in 22/22 2p+/CLL samples (Supplementary Table S1). Additionally, we found that the *XPO1* gain was often subclonal, suggesting that it tends to arise late in leukemic development (Figure 1B and Supplementary Table S1). Longitudinal FISH analyses, performed on 8 CLL-treated patients, showed a similar or increasing percentage of cells carrying *XPO1* gain at relapse, when compared to diagnosis (Figure 1C and Supplementary Table S3). This result substantiates the potential relevance of *XPO1* in CLL drug resistance.

Next, we investigated the 2p+ associated to *XPO1* expression. Comparison between B-lymphocytes from healthy donors, 2p-/CLL (without 2p gain), and 2p+/CLL showed a significant *XPO1* overexpression in the 2p+/CLL samples (Figure 1D). The 2p+ also associated with *USP34*, *AHSA2*, *REL*, *BCL11A* and *TTC27* overexpression (Supplementary Figure S2).

The further *XPO1* sequencing of CLL samples identified mutations in 23/436 CLL, including 2 CLL patients with 2p+ (Supplementary Table S1). Note that, compared to 2p-/CLL, the frequency of *XPO1*-mutations was not significantly higher in 2p+/CLL. Strikingly, all *XPO1* mutations identified targeted the residue E571, which is localized in the binding domain of the protein. More precisely, we observed 14/25 E571K (including the two 2p+/CLL), 4 E571G, 3 E571V, 2 E571A, and 2 E571Q.¹⁷ All mutations changed a glutamic acid to a basic residue. Such recurrent and missense mutations are highly suggestive of a gain-of-function.

Selinexor, a novel *XPO1* inhibitor currently in Phase I/II clinical trials, restores subcellular localization of deregulated molecules and exhibits antitumor activity in several hemopathies, including CLL.¹⁸⁻²¹ As depicted in the Supplementary Figure S3, Selinexor induced PCD in tumor cells from CLL patients, independently of prognostic factors, but had no effect on the B-cells from healthy donors. Interestingly, the non-leukemic cells of the CLL patients were spared by the Selinexor treatment, confirming that *XPO1* represents a potential therapeutic target in CLL.^{18,22} From a mechanistic point of view, Selinexor-induced PCD in CLL through a caspase-dependent mechanism. This type of death, which is precluded by caspase-inhibitors and induces the activation of caspase-3, provoked a mitochondrial dysfunction and the upregulation/activation of the pro-apoptotic protein Bax (Supplementary Figure S4).

We next tested the sensibility of the 2p+ samples (*XPO1*-WT) to commonly used anti-CLL drugs and Selinexor. When compared to control 2p-/CLL, 2p+/CLL cells were significantly less sensitive to the PCD induced either by FCR, Ibrutinib, R-Idelalisib, or Selinexor (Figure 2A). It seems therefore that the *XPO1* overexpression associated to 2p+ is sufficient enough to preclude the PCD action of Selinexor. Moreover, the resistance of 2p+/CLL to anti-CLL drugs seems specific to 2p+ and not to be related to other poor prognostic CLL markers or the overexpression of relevant

anti-apoptotic Bcl-2 family members (Supplementary Figure S3 and Supplementary Figure S5).

In order to evaluate the therapeutic interest of Selinexor in CLL more broadly, we compared its PCD effect in *XPO1*-WT and *XPO1*-mutated CLL cells. As represented in Figure 2B, Selinexor is significantly less efficient in the *XPO1*-mutated cells. In contrast, the treatment of *XPO1*-WT and *XPO1*-mutated B-cells with FCR or Ibrutinib does not reveal differences in the PCD response. Altogether, these data indicate that the mutations in *XPO1* characterizing CLL block the cytotoxic effects of Selinexor, whereas they do not affect the sensibility of the malignant B-cells to FCR or Ibrutinib.

Overall, our work confirms the frequency and the adverse prognostic of 2p+ in CLL and demonstrates that this cytogenetic alteration provokes FCR, Ibrutinib, R-Idelalisib, and Selinexor drug resistance. Our results also reveal that Selinexor is inefficient in inducing PCD in CLL B-cells with mutations in *XPO1*. Altogether, our work advocates for the assessment of the 2p+ and *XPO1* mutations before deciding a CLL therapy. As 2p+ is observed in other B malignancies, we could propose to extend these recommendations to all Selinexor treatments.

Acknowledgments

The authors thank the Centre de Ressource Biologique de Caen for Lepretre's trial samples. We are also grateful to O Bernard for critical comments, X Troussard, R Guieze, L Ysebaert, S Struski, E Fonteneau, R Delepine, and L Cabon for invaluable help.

This work was supported by Roche Diagnostics, the Association Laurette Fugain (ALF10/09, ALF14/08), Ligue Contre le Cancer (RS15/75-63), and Fondation ARC (Association pour la Recherche Medicale) (SFI20111203530). AC holds PhD fellowships from Fondation pour la Recherche Medicale (FDT20140931078) and Société Française d'Hématologie.

Author contributions

AC conceived and performed experimental work, analyzed the data, and helped to write the manuscript. EC, HAC, CA, CG conceived and performed experimental work and analyzed the data. FD, HMB, SC, MU, VM, VL, KM, SL, PF, LS enrolled patients

and managed CLL samples. JL, CL, JLe performed statistical analysis. YL provided Selinexor and KPT-301. SAS and FNK conceived and supervised the project, designed experiments, interpreted the data, and wrote the manuscript.

Disclosure of conflicts of interest

YL is an employee of Karyopharm Therapeutics Incorporated and receive compensation and hold equity in the company. The other authors declare no competing financial interests.

References

1. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475(7354):101–5.
2. Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 2012;44(1):47–52.
3. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2011;365(26):2497–506.
4. Damm F, Mylonas E, Cosson A, et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov.* 2014;4(9):1088–101.
5. Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia: Where We Are and Where We Go. *Biomed Res. Int.* 2014;2014:435983.
6. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner a, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2000;343(26):1910–6.
7. Chapiro E, Leporrier N, Radford-Weiss I, et al. Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk. Res.* 2010;34(1):63–68.
8. Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, et al. Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood.* 2007;109(3):1202–10.
9. Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S, et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *PNAS.* 2004;101(4):1039–44.
10. Beà S, López-Guillermo A, Ribas M, et al. Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *Am. J. Pathol.* 2002;161(3):957–68.

11. Sutton L, Chevret S, Tournilhac O, et al. Autologous stem cell transplantation as a first-line treatment strategy for chronic lymphocytic leukemia: a multicenter, randomized, controlled trial from the SFGM-TC and GFLLC. *Blood*. 2011;117(23):6109–19.
12. Lepretre S, Aurran T, Mahé B, et al. Excess mortality after treatment with fludarabine and cyclophosphamide in combination with alemtuzumab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia in a randomized phase 3 trial. *Blood*. 2012;119(22):5104–10.
13. Martinez-Torres A-C, Quiney C, Attout T, et al. CD47 Agonist Peptides Induce Programmed Cell Death in Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells via PLCy1 Activation: Evidence from Mice and Humans. *PLOS Med*. 2015;12(3):e1001796.
14. Edelmann J, Holzmann K, Miller F, et al. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*. 2012;120(24):4783–94.
15. Rinaldi A, Mian M, Kwee I, et al. Genome-wide DNA profiling better defines the prognosis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol*. 2011;154(5):590–9.
16. Turner JG, Dawson J, Sullivan DM. Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Biochem. Pharmacol*. 2011;83(8):1021–32.
17. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, et al. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*. 2014;28(1):108–17.
18. Zhong Y, El-Gamal D, Dubovsky J a, et al. Selinexor suppresses downstream effectors of B-cell activation, proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2014;(January):1–5.
19. Walker CJ, Oaks JJ, Santhanam R, et al. Preclinical and clinical efficacy of XPO1/CRM1 inhibition by the karyopherin inhibitor KPT-330 in Ph+ leukemias. *Blood*. 2013;122(17):3034–44.
20. Hing Z a., Mantel R, Beckwith K a., et al. Selinexor is effective in acquired resistance to ibrutinib and synergizes with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;
21. Ranganathan P, Yu X, Na C, et al. Preclinical activity of a novel CRM1 inhibitor in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;120(9):1765–73.
22. Lapalombella R, Sun Q, Williams K, et al. Selective inhibitors of nuclear export show that CRM1/XPO1 is a target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;120(23):4621–34.

Figure legends

Figure 1. *XPO1* is overexpressed in 2p+/CLL cells. (A) Schematic representation of the minimal gained region in the short arm of the chromosome 2 (2p) identified in 23 2p+/CLL by SNP-array. Full lines represent the gained regions in individual 2p+ patient. This approach yields the gain of two minimal regions. One region of 674 kb in 2p22.3 included *TTC27*. The second region of 1.28 Mb placed in p16.1-p15 encompassed the indicated 10 genes. (B) The percentage of cells carrying a *XPO1* gain was determined by FISH in 24 2p+/CLL patients and plotted as a histogram. (C) Monitoring of lymphocytosis and cytogenetic abnormalities in two representative 2p+/CLL patients upon treatment. The vertical axis shows lymphocytosis and follow-up is reported on the horizontal axis. Color-coded circles show the percentage of cells carrying the indicated cytogenetic abnormality. Arrows represent clinically relevant time points. *Left* (Patient CLL_10): Before treatment, the major clones unveiled by FISH are del(17p) and tri12 (93 % and 67 % of cells; respectively). At this stage, *XPO1* gain was only present in a sub-clone representing 5 % of cells. At relapse, del(17p) and tri 12 were still present (84 % and 75 %, respectively), and the *XPO1* gain had expanded to 65 % of the malignant cells. *Right* (Patient CLL_25): At diagnosis, *XPO1* gain surrogate of 2p+ is present as a major clone in 40 % of cells, whereas del(13q) is observed in 16 % of cells. After treatment, lymphocytosis progressively increased. Sample at 40 months was positive for *XPO1* gain (34 % of cells) but negative for del(13q). (D) *XPO1* mRNA levels were determined by real-time RT-PCR in CD19+ cells purified from healthy donors ($n = 12$), CLL patients without 2p gain (2p-) ($n = 28$), or with CLL individuals with 2p gain (2p+) ($n = 16$). The *ABL1* mRNA expression was used to normalize the data. The plot depicts the mean \pm s.d. NS: non significant. The statistical analysis was performed with the Mann-Whitney test.

Figure 2. 2p+ confers resistance to FCR, Ibrutinib, R-Idelalisib, and Selinexor. The mutations in *XPO1* in CLL block the effect of Selinexor. (A) Apoptosis was measured by a double Annexin-V and Propidium Iodide (PI) staining in 2p-/XPO1-WT ($n=20$) and 2p+/XPO1-WT ($n=8$) CLL cells untreated (Control) or treated during 24 h with FCR (35 μ M; 5 mM; 10 μ g/mL), Ibrutinib (15 μ M), Selinexor (250 nM), or the negative control KPT-301 (250 nM). Alternatively, 2p-/XPO1-WT ($n=10$) and 2p+/XPO1-WT ($n=4$) CLL cells were treated with R-idelalisib (10 μ g/mL; 50 μ M).

Representative flow cytometry plots are shown. The percentages refer to Annexin-V positive and Annexin-V/PI co-positive staining. In the right histogram, CLL cells were treated as above and, after accounting for spontaneous apoptosis, the percentage of Annexin-V positive and Annexin-V/PI co-positive cells was quantified and plotted. Crosses and dots represent individual samples. Bars are the mean \pm s.d. Green and red symbols represent samples with del(11q) and del(17p), respectively. **(B)** Apoptosis was measured as in **(A)** in 2p-/XPO1-WT (n=20) and 2p-/XPO1-mutated (n=6) CLL samples untreated (control) or treated as in (A). The statistical analysis was performed with the Mann-Whitney test.

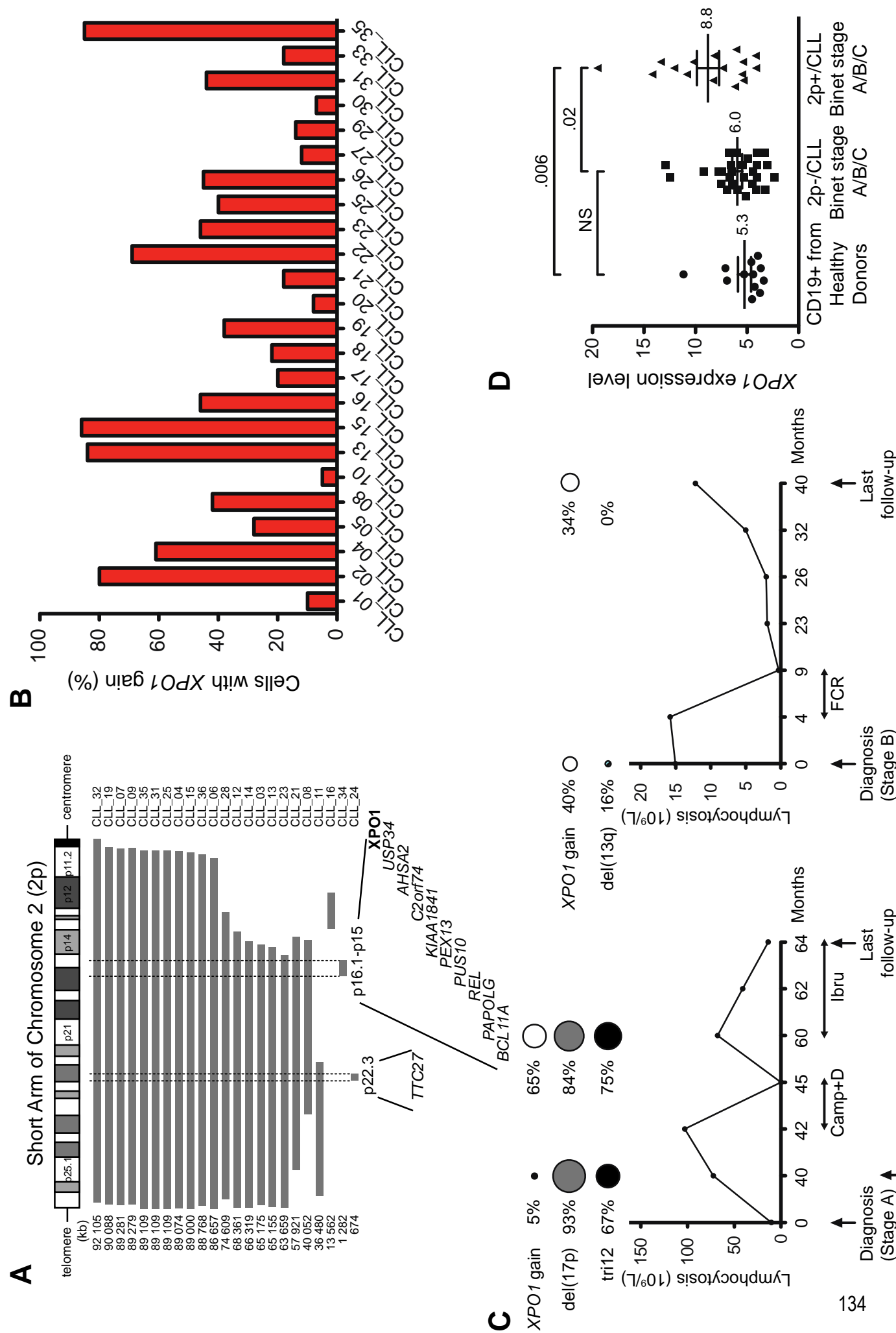
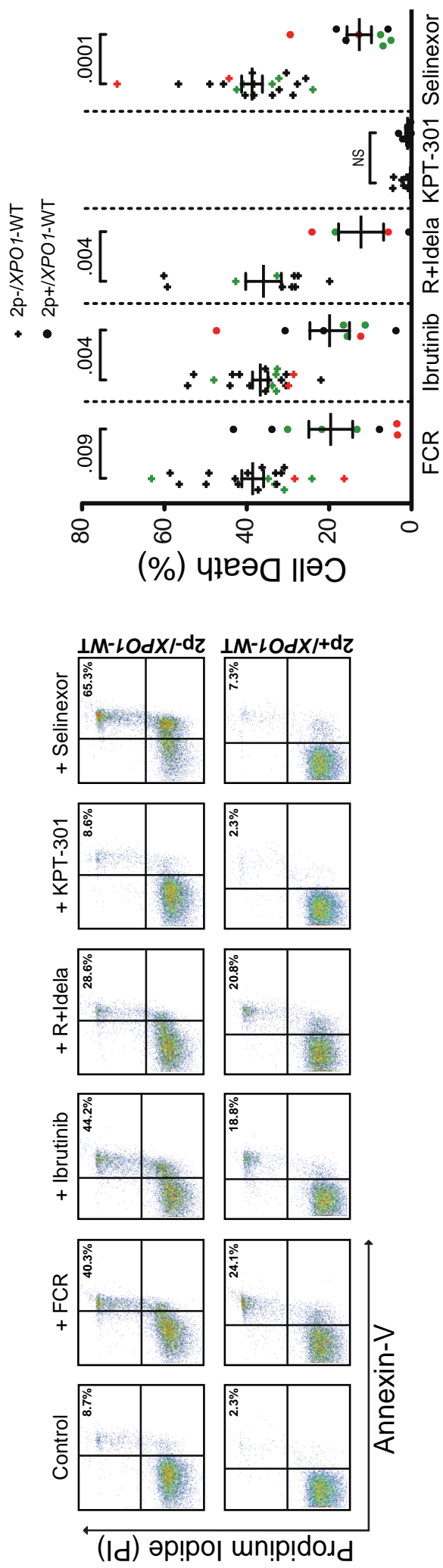


Figure 1. XPO1 is overexpressed in 2p+/CLL cells.

A



B

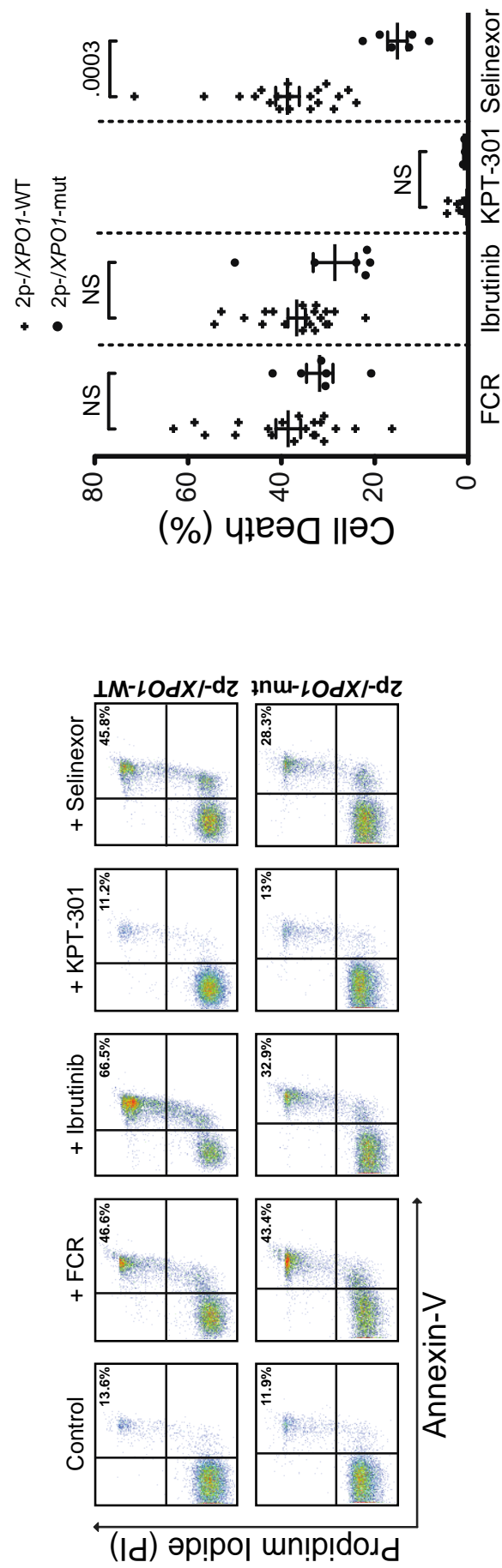


Figure 2. 2p+ confers resistance to FCR, Ibrutinib, R-Idelalisib, and Selinexor. The mutations in XPO1 in CLL block the effect of Selinexor.

SUPPLEMENTARY METHODS

CLL patients, cell purification, and culture conditions. After obtaining written consent, peripheral blood was collected from CLL patients diagnosed according to classical morphological and immunophenotypic criteria. This includes clinical Binet Staging and the biological parameters *IGHV* mutational status, CD38, and ZAP-70 levels. Peripheral blood samples from healthy donors, used as control in some experiments, were provided by the French Blood Establishment transfusion center.

Mononuclear cells were purified from blood samples using a standard Ficoll-Hypaque gradient, and B- and CD19⁺-cells were purified as previously described¹ and cultured in complete medium (RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine and 100 U/ml penicillin-streptomycin). In drug-induced PCD experiments, B-cells and PBMC were cultured in the presence of IL-2 (20 U/mL, Roche) and CpG (1 μ M, AmpliTech).

Chromosome banding analysis and FISH. Chromosome banding analyses were performed according to the usual techniques to obtain R-banded chromosomes from peripheral blood. The samples were cultured for 72 hours and stimulated with CpG-oligonucleotides and IL-2. FISH was performed on interphase nuclei and metaphases, following standard procedures and using specific probes: IGH (Dako, Trappes, France), CEP12, 13q14 (D13S319), ATM, p53 (Abbott, Rungis, France), 6q21(SEC63) (Kreatech, Strasbourg, France). Home-grown bacterial artificial chromosome (BAC) probes, RP11-477N2 and RP11-240F4, covering the gene *XPO1* on 2p15, were selected using the University of California Santa Cruz Genome Bioinformatic database (NCBI37/hg19 build) and obtained from Genoscope (Evry, France).

SNP-arrays

We used an Illumina Omni1-quad ($n=76$) or an Illumina Omni-2.5-8 array ($n=55$) (Illumina, San Diego, California). Samples were processed using the Infinium assay according to the manufacturer's protocols (Illumina), and results were analyzed using Illumina GenomeStudio software. Reference standards were constructed with the cluster files provided by Illumina. SNP profiles were analyzed by comparing the Log-R ratio, i.e., $\ln(\text{sample copy number}/\text{reference copy number})$, and the B-allele

frequency (BAF). The Log-R ratio can detect copy-number variations (CNV): a positive Log-R ratio indicates a gain in copy number whereas a negative Log-R ratio indicates a loss in copy number. The BAF indicates the genotype of each SNP: e.g., for an SNP with two copies, a BAF of 0 indicates an AA genotype, a BAF of 0.5 indicates an AB genotype, and a BAF of 1 indicates a BB genotype. The precision of breakpoints was + or –1 kb. Aberrant copy-number segments were cross-checked against the public Database of Genomic Variants (DGV, <http://projects.tcag.ca/variation>) and visually inspected using GenomeStudio software: segments that were matched with a known variation and had an allele-B frequency compatible with a homogeneous copy-number alteration were considered to have constitutional copy-number polymorphisms and were excluded from our analyses.²

Mutational analyses

Genomic DNA (gDNA) was extracted from lymph-node, blood, or bone-marrow samples using an AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The mutation hot spots in *NOTCH1* (exon 34), *SF3B1* (exons 14-16), *XPO1* (exons 14-15), *MYD88* (exon 5), *TP53* (exons 4-10) were analyzed by PCR amplification and direct sequencing, as previously described.³

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using the Nucleospin® RNA II kit (Macherey-Nagel). cDNA was prepared using Superscript® II reverse transcriptase (Life Technologies).¹ Quantitative RT-PCR was performed using TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies) for *TTC27* (Hs00214686_m1); *BCL11A* (Hs00256254_m1); *XPO1* (Hs00418963_m1); *PAPOLG* (Hs00224661_m1); *REL* (Hs00231279); *PEX13* (Hs00159996_m1); *KIAA1841* (Hs01376423_m1); *AHSA2* (Hs00406870_m1); *USP34* (Hs00611330_m1); *PUS10* (Hs00328708_m1); *BCL-2* (Hs00153350_m1); *MCL-1* (Hs00172036_m1); *BCL-XI* (Hs00236329_m1); *BAX* (Hs00180269_m1); *BIM* (Hs00708019_m1); *BAK* (Hs00832876_m1). PCR reactions were carried out in duplicate, using TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies) according to manufacturer's recommendations. Products were amplified with a 7500 Fast Real-time PCR System (Life Technologies) at 60°C for 40 cycles. Data were analyzed

using the comparative threshold cycle method. The *ABL1* expression was utilized to normalize the data.

Protein Extraction and Immunoblotting

Cell fractions were lysed in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, and 1 mM EDTA supplemented with anti-protease and anti-phosphatase cocktails (Roche). The protein concentration was determined using the Bio-Rad DC kit, and protein was loaded onto linear SDS-PAGE gels. After blotting, nitrocellulose filters were probed with primary antibodies against activated caspase-3 (9661; Cell Signaling Technology) and α -tubulin (clone B-5-1-2; Sigma). Immunoreactive proteins were detected using HRP-conjugated secondary antibodies and visualized with the ECL system (Thermo Scientific). Immunoblot images were acquired on a MF-ChemiBIS 4.2 (DNR Bio-Imaging Systems).

Flow cytometry assessment of Bax activation was performed as described elsewhere.⁴

Statistical analyses for clinical data were calculated as previously described.³ One-way Anova and Mann-Whitney tests were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software).

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Martinez-Torres AC, Quiney C, Attout T, et al. CD47 agonist peptides induce programmed cell death in refractory chronic lymphocytic leukemia B cells via PLCgamma1 activation: evidence from mice and humans. *PLoS Med.* 2015;12(3):e1001796.
2. Cosson A, Chapiro E, Belhouachi N, et al. 14q deletions are associated with trisomy 12, NOTCH1 mutations and unmutated IGHV genes in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014;53(8):657-666.
3. Damm F, Mylonas E, Cosson A, et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov.* 2014;4(9):1088-1101.
4. Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, et al. Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2002;100(5):1810-1816.

!

FISH [% of interphase nuclei]

Patients	Gender	Age at Diagnosis	Binet Stage at Diagnosis	Binet Stage at Karyotype	Karyotype	2p gain (XPO1)	del(11q)	tr12	del(13q)	de(17p)	IGHV genes	SF3B1	TP53	NOTCH1	XPO1	MYD88	Time to First Treatment (months)	Treatments	Follow-up (months)#
CLL_01	M	47	B	B	46,XY,ins(4;2)(q28;q11q21)[6]/46,XY[t(4]	+ [10%]	-	-	+ [29%]	-	UM	WT	R280G	WT	WT	WT	5	CHOP+F, FCR, RDHAP, BEAM, Campath, HSCT	[55.7] d
CLL_02	M	71	A	B	44,XY,der(11)(q21;q14,q275)(t(4;19)(q4ter>14p11;-19?qter>19p1er),der(16)(t(16;17)(q23;q12),-17,-19)[17]/46,XY[3]	+ [80%]	-	-	+ [11%]	+ [89%]	UM	WT	WT	P2515_delCT	WT	WT	44	Campth+D, RDC, R+idelisib	[99.9] a
CLL_03	M	56	A	B	46,XY,del(11)(q14)[6]/45,idem,-4,add(2p),add(16q)x2[6]/46,XY[39]	nd	+ [80%]	-	-	-	UM	WT	WT	WT	WT	WT	23	CHOP+F+DHAP, Campath	[61.2] d
CLL_04	M	61	B	B	45,XY,-8,-8,-15,-17,-21,-22,-mar1,-mar2,-mar3,-mar4,-t(12)/46,XY[7]	+ [61%]	-	-	-	+ [70%]	UM	WT	splice site heterozygous mutation end of intron 8, beginning exons	WT	WT	WT	2	CHOP+F+DHAP, FCR	[33.7] d
CLL_05	M	66	A	B	46,XY,der(18)(2;18)(p11;p11)(13)/46,XY(t(1;13)(p36;q14)[2]/46,XY,del(1)(q31)[2]/46,XY[3]	+ [28%]	-	-	+ [24%]	-	nt	nd	nd	nd	nd	nd	11	CB, F, Campath, Rbenda	[118.9] a
CLL_06	M	53	B	B	46,XY[21]	nd	+ [89%]	-	+ [86%]	-	UM	WT	WT	WT	WT	WT	0.1	CHOP	[0.2] d
CLL_07	M	46	A	B	46,XY[6]	nd	+ [13%]	-	+ [84%]	-	UM	nd	nd	nd	nd	nd	67	CHOP+F+DHAP, FCR	[150.7] a
CLL_08	M	74	B	B	46,XY,del(11)(q14q23)[11]/46,idem,dup(2)(p173p272)[6]	+ [42%]	+ [88%]	-	+ [74%]	-	UM	WT	WT	WT	WT	WT	8	FCR	[31.1] a
CLL_09	M	62	C	C	46,XY[20]	nd	+ [70%]	-	+ [67%]	-	UM	WT	WT	WT	WT	WT	8	CHOP	[108.3] a
CLL_10	F	65	A	B	47,XX,+12,del(17)(p12)[2]/46,si-X[4]/46,XX,der(2)(2pter>p27:-?;p27:-q10;-8q11;-8qter)-8,+12,(17)(q10)[12]/46,XX[2]	+ [5%]	-	+ [67%]	-	+ [83%]	UM	WT	WT	WT	WT	WT	42	Campath+D, Ibrutinib	[66.6] a
CLL_11	M	62	B	B	46,XY[33]	nd	-	-	-	+ [54%]	nt	H662D	WT	WT	WT	WT	1	CHOP+F	[67.9] d
CLL_12	M	42	C	C	46,XY,del(11)(q14)[3]/46,XY[30]	nd	+ [60%]	-	+ [7%]	-	UM	WT	WT	WT	WT	WT	8	CHOP+F+DHAP+ASCT, FCR	[105.7] a
CLL_13	M	56	B	B	46,XY,del(11)(q23),add(14)(p11)[3]/46,idem,add(22)(q13)[10]/46,idem,del(1)(q22),add(13)(q34),add(14)(q31)[7]/46,XY[19]	+ [84%]	+ [92%]	-	+ [20%]	-	UM	WT	WT	WT	WT	WT	60	CHOP	[124.1] d
CLL_14	F	61	B	B	nd	nd	+ [30%]	-	-	-	M	K700E	WT	WT	WT	WT	3	CHOP+F, DHAP	[38.1] d
CLL_15	F	59	C	C	45,XX,add(8)(p273),add(11)(q23),der(12)(12;17)(p173;q12),-17[10]/44,idem,-8,-13,-mar[cp9]/46,XX[2]	+ [86%]	-	-	+ [78%]	+ [94%]	UM	nd	c.818G>A	WT	nd	WT	1	Campath+D	[16.3] a
CLL_16	M	57	B	B	46,XY,add(5)(p15),del(10)(q25q25),del(17)(p11)[5]/46,idem,add(3)(p11)[6]/46,XY[3]	+ [46%]	nd	nd	-	nd	UM	K700E	splice site homozygous mutation end of exon5, beginning intron5-6	WT	WT	WT	3	CHOP	[11.7] d
CLL_17	M	53	A	B	46,XY[20]	+ [20%]	-	-	+ [90%]	-	UM	WT	WT	WT	E571K	WT	22	FCR, HSCT	[72.8] d
CLL_18	M	44	A	A	46,XY,del(11)(q14q22)[17]/46,XY,dup(2)(p172p275)[3]	+ [22%]	+ [88%]	-	+	-	UM	nd	nd	nd	nd	nd	22	FCR	[29.3] a
CLL_19	M	56	B	B	46,XY,t(21;7)(p11;7)[2]/46,XY[28]	+ [38%]	-	-	+ [14%]	-	UM	WT	WT	WT	WT	WT	1	CHOP+F+DHAP+ASCT, FCR, HSCT	[63.1] d
CLL_20	M	61	A	A	46,XY,del(11)(q14q22)[12]/46,idem,der(2;18)(p10;q10),-18[9]/46,XY[6]	+ [8%]	+ [53%]	-	+ [91%]	-	M	WT	WT	WT	WT	WT	na		
CLL_21	M	72	B	B	46,XY,del(11)(q14q22)[3]/46,idem,dup(2)(p176p275)[4]/46,XY[6]	+ [18%]	+ [59%]	-	+ [10%]	-	UM	G742D	WT	WT	WT	WT	9	FCR	[49.9] a

Patients		Gender	Age at Diagnosis	Binet Stage at Diagnosis	Binet Stage at Karyotype	Karyotype	FISH [% of interphase nuclei]					IGHV genes	SF3B1	TP53	NOTCH1	XPO1	MYD88	Time to First Treatment (months)	Treatments	Follow-up (months)#
							2p gain (XPO1)	del(11q)	tr12	del(13q)	de(17p)									
CLL_22	M	72	A	A		46,XY,del(11)(q14q24),der(22)(t(22;22)(p11;p11))[18]/46,XY,due(2)(p17p27q),del(11)(q14q24)[1]/46,XY[1]	+ [69%]	+ [88%]	-	-	-	UM	WT	WT	WT	WT	92	R+Benda	[97.1] a	
CLL_23	M	55	B	B		46,XY,del(11)(q13)/3/46,XY[27] ; 46,XY[40]	+ [46%]	+ [90%]	-	-	-	UM	WT	WT	WT	WT	6	CHOP+F+DHAP, FCR	[95.6] a	
CLL_24	M	58	A	B		46,XY,del(6)(q17q24q27q4)[3]/46,XY[2]	-	+ [35%]	-	-	-	M	G742D	WT	WT	WT	25	CHOP+F+DHAP, FCR	[152.8] d	
CLL_25	M	49	B	B		46,XY+der(2;18)(p10;q10),-18(11)/46,XY[9]	+ [40%]	-	-	+ [16%]	-	UM	WT	WT	WT	WT	4	FCR	[40.8] a	
CLL_26	F	50	A	B		46,XX,-16,-17,-20,+3mar[4]	+ [45%]	-	-	-	-	UM	WT	WT	WT	WT	32	CHOP+F+DHAP	[122.6] a	
CLL_27	M	69	A	A		46,XY+2,der(2;20)(p10;q10)[2]/46,XY[18]	+ [12%]	-	-	+ [96%]	-	M	WT	WT	WT	WT	no treatment		[72.5] a	
CLL_28	M	53	A	B		46,XY[40]	nd	+ [11%]	-	+ [67%]	-	UM	WT	WT	WT	WT	49	CHOP+F+ASCT	[184.2] a	
CLL_29	M	57	B	B		46,XY,del(13)(q13q21)[1]/46,XY[3]	+ [14%]	-	-	+ [17%]	-	UM	WT	WT	WT	WT	1	CHOP+F+DHAP+ASCT, FCR	[88] d	
CLL_30	F	71	A	A		45,XX,der(17)t(17;18)(p12;p11),-18(7)/45,dem.add(2)(q37)[2]	+ [7%]	-	-	+ [82%]	+ [86%]	M	WT	WT	WT	WT	34	Campath+D, C, Flavopiridole	[90.4] d	
CLL_31	F	60	B	B		46,XX,der(18)t(2;18)(p17;p21)[12]/46,XX,t(6;13)(q27;q13)[q]/46,XX[4]	+ [44%]	-	-	+ [80%]	-	M	WT	WT	WT	WT	72	CB, FCR, R+Benda, Gemcitabine, Ibutilib	[304.4] a	
CLL_32	F	na	B	B		46,XX[13]	nd	nd	nd	nd	nd	UM	WT	WT	WT	WT		CHOP+F+ASCT, Campath	[132.3] a*	
CLL_33	M	60	A	B		46,XY,add(8q)[8]/46,XY[19]	+ [18%]	-	-	+ [98%]	-	UM	WT	WT	WT	E57IK	26	CHOP, Campath	[115.6] d	
CLL_34	M	59	B	B		46,XY[20]	nd	+ [12%]	-	-	-	UM	nd	nd	nd	nd	4	CHOP+F, FC	[54.5] d	
CLL_35	F	60	B	B		45,XX,add(2)(q12q14),-3,add(6)(q714),add(17)(p13),-21,+mar[cp14]/45,XX,add(6)(q716),add(11)(q23),add(17)(p13),-22/3/46,XX[3]	+ [86%]	-	-	-	+ [91%]	UM	WT	V272M	WT	WT	2	FC, Campath	[19.8] a	
CLL_36	M	61	B	B		47,XY,del(1)(q25q41),del(11)(q14),mar[1]/47,XY,del(1)(q25q41),-2,der(6)t(6;13)(q26;q22),-10,del(11)(q14),-13,-15,+max[2]/46,XY[2]	nd	+ [95%]	-	nd	+ [18%]	UM	WT	WT	WT	WT	4	CHOP+F	[89] a	

na = not done
na = not available

na = not available

ASCT: Autologous Stem Cell Transplantation; HSCT: Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation; D: Dexamehasone; DHAP: Dexamehasone Cyclophosphamide-Rituximab; BEAM: BCNU, Etoposide, Aracytine, Melphalan; CB: Chlorambucil; CHOP: Cyclophosphamide-Doxorubicine-Vincristine Prednisone;

Follow up : survival was calculated from diagnosis

a = alive

d = dead

* Follow-up was measured from inclusion to the last follow-up

The median overall survival measured on 35 patients was 124,1 months, 95% CI [72.7 ; 152.8]

Supplementary Table S1 : Clinical and biological characteristics of 36 2p+/CLL.

		2p- CLL	2p+ CLL	p-value
		n=111	n=21	
Gender	Male	83/111	18/21	86,00%
	Female	28/111	3/21	14,00%
Age at inclusion years		111	21	58 [55;61]
Binet stage at diagnosis	B	88/111	18/21	86,00%
	C	23/111	3/21	14,00%
Lymphocytosis at inclusion (10 ⁹ /L)		110	21	82.6 [59.2; 12.4]
Complex Karyotype		16/96	6/18	33%
Cytogenetic abnormalities (FISH)		23/101	12/19	63,00%
		11/104	0/19	0%
		54/99	10/18	56,00%
		6/101	3/19	16,00%
IGH unmutated status		67/105	18/20	90%
SF3B1 mutated		16/105	4/18	22,00%
TP53 mutated		9/105	2/18	11,00%
NOTCH1 mutated		11/105	0/18	0%
XPO1 mutated		9/105	1/18	66,00%
MYD88 mutated		1/105	0/18	0%
TFS		106	20	7,2 [2,4; 25,4]
OS				127,4 [62,3; NA]

Complex karyotype: ≥ 3 abnormalities

OS: Overall Survival

TFS: Time from Diagnosis to First Treatment

ns: not significant

NA: not available

qualitative data are presented with count and percentage among non missing values range

quantitative data are presented with number of non missing values, median and interquartile range, except for OS wich is presented with median and its 95% confidence interval

Supplementary Table S2 : Characteristics of 2p+ CLL and 2p- CLL included in the clinical trial by Sutton et al.

Patients	Follow-up from diagnosis (months)	Status	Treatment	Lymphocytosis (10 ⁹ /L)	Karyotype	FISH [% of interphase nuclei]				
						2p gain (XPO)	del(11q)	trn12	del(13q)	de(17p)
CLL_31	0	diagnosis (Binet stage A)								
	60	Binet stage B	splenectomy, CB							
	144			45,8	46,XX,der(18)(2;18)(p172;p11)[12]/46,XX,t(6;13)(q275;q173)[4]/46,XX[4]	+ [44%]	-	-	+ [80%]	-
	153		FOR	144						
	183	relapse	R+Benda							
	188			94,6	46,XX,der(18)(2;18)(p172;p11)[3]/46,XX[8]	+ [46%]	-	-	+ [81%]	-
	200	relapse	C+Benda	18.4						
	203		CHOP	55.5						
	215		Gemci	171.7	46,XX,der(18)(2;18)(p172;p11)[4]/46,XX[16]	+ [21%]	-	-	+ [90%]	-
	219		CB	245.9						
CLL_25	231	relapse	R+Ibru	240						
	0	diagnosis (Binet stage B)								
	40	relapse	FOR	15.05	46,XY,+der(2;18)(p10;q710),-18(11)/46,XY[9]	+ [40%]	-	-	+ [16%]	-
				12.2	46,XY,+der(2;18)(p10;q710),-18(3)/46,XY[17]	+ [34%]	-	-	-	-
	0	diagnosis (Binet stage A)								
	26			8.84						
	40	Binet stage B		17.86		nd	-	-	-	+ [51%]
	43		Campath+D	44	44,XY,der(11)(2;11)(p21;q275),t(14;19)(q21;q14),-19(17)/46,XY[3]	+ [80%]	-	-	+ [11%]	+ [89%]
	79		R+D+C	35.2						
	92		R+Idela	65.5	43,XY,add(11)(q23),add(12)(p173),-13,t(14;19)(q21;q14),-19(17)/46,XY[3]	+ [90%]	-	-	+ [81%]	+ [88%]
CLL_10	0	diagnosis (Binet stage A)								
	40	Binet stage B								
	42		Campath+D	103						
	60	relapse		67.9	46,XX,der(2)(2pter>p2?::p2?>q10;8q11->8qter),-8,+12,add(17)(p172)[12]/46,XX[2]	+ [65%]	-	+ [75%]	-	+ [84%]
	64		Ibru	11						
	0	diagnosis (Binet stage A)								
	40	Binet stage B		10.4						
	42		Campath+D	72.5	47,XX,+12,del(17)(p12)[2]/46,sl,-X(4)/46,XX,der(2)(2pter>p2?::p2?>q10;8q11->8qter),-8,+12,add(17)(p172)[12]/46,XX[2]	+ [5%]	-	+ [67%]	-	+ [93%]
	60	relapse		103						
	64		Ibru	67.9	46,XX,der(2)(2pter>p2?::p2?>q10;8q11->8qter),-8,+12,t(17)(q10)[10]	+ [65%]	-	+ [75%]	-	+ [84%]
CLL_30	0	diagnosis (Binet stage A)								
	34	Binet stage B		19.93	46,XX,t(17;18)(p12;p11)[2]/46,XX,der(2)(q37)[2]/46,XX[11]	-	-	-	+ [45%]	+ [37%]
	42		Campath, F+Campath	87.69						
	47		Campath+D	5.38						
	63	relapse		18.75	45,XX,der(17)(17;18)(p12;p11),-18(7)/45,der(2)(q37)[2]	+ [7%]	-	-	+ [82%]	+ [86%]
	74		Flavopitidol	14.43	45,XX,der(17)(17;18)(p12;p11),-18(10)/45,der(2)(q37)[4]/46,XX,der(17)(17;18)(p12;p11),+18(5)/46,XX[1]	+ [20%]	-	-	+ [91%]	+ [87%]
	90	dead		42.74	46,XX,der(17)(17;18)(p12;p11),-18(18)/46,sl,add(2)(q37)[1]/46,sl2,+18(1)	+ [20%]	-	-	+ [86%]	+ [73%]
	0	diagnosis (Binet stage B)								
	6	relapse	CHOP+F	59	46,XY,ins(4;2)(q28;q11q21)[6]/46,XY[14]	+ [<5%]	-	-	-	-
	39		FOR, RDHAP, BEAM	52.79	46,XY,ins(4;2)(q28;q172q14)[7]/45,XY,der(3;12)(p274;q24)[3]/46,XY[3]	+ [10%]	-	-	-	-
CLL_17	49		Campath							
	50	dead	HSCT							
	0	diagnosis (Binet stage A)								
	24	Binet stage B		65.92						
	61	relapse	FOR							
			HSCT							

Patients	Follow-up from diagnosis (months)	Status	Treatment	Lymphocytosis (10 ⁹ /L)	Karyotype	FISH [% of interphase nuclei]				
						2p gain (XPO)	del(11q)	trn12	del(13q)	de(17p)
	73 dead									
CLL_18	0 diagnosis (Binet stage A)			27.61/46,XY,del(11)(q22)q22[18]/46,XY[2]		+ [22%]	+ [68%]	-	+ [9%]	-
	22 Binet stage B		FOR	48.95/46,XY,del(11)(q14q22)[17]/46,XY,dup(2)(p12p25)[3]		+ [26%]	+ [68%]	-	+ [9%]	-

nd: not done

HSCT: Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation; Gemci: Gemcitabine; Ibru: Ibrutinib; D: Dexamehasone; DHAP: Dexamehasone Cytarabin-Cisplatin; FCR: Fludarabine-Cyclophosphamide-Rituximab; BEAM: BCNU, Etoposide, Aracyline, Melphalan; CB: Chlorambucil; CHOP: Cyclophosphamide-Doxorubicine-Vincristine Prednisone; Benda: Bendamustine

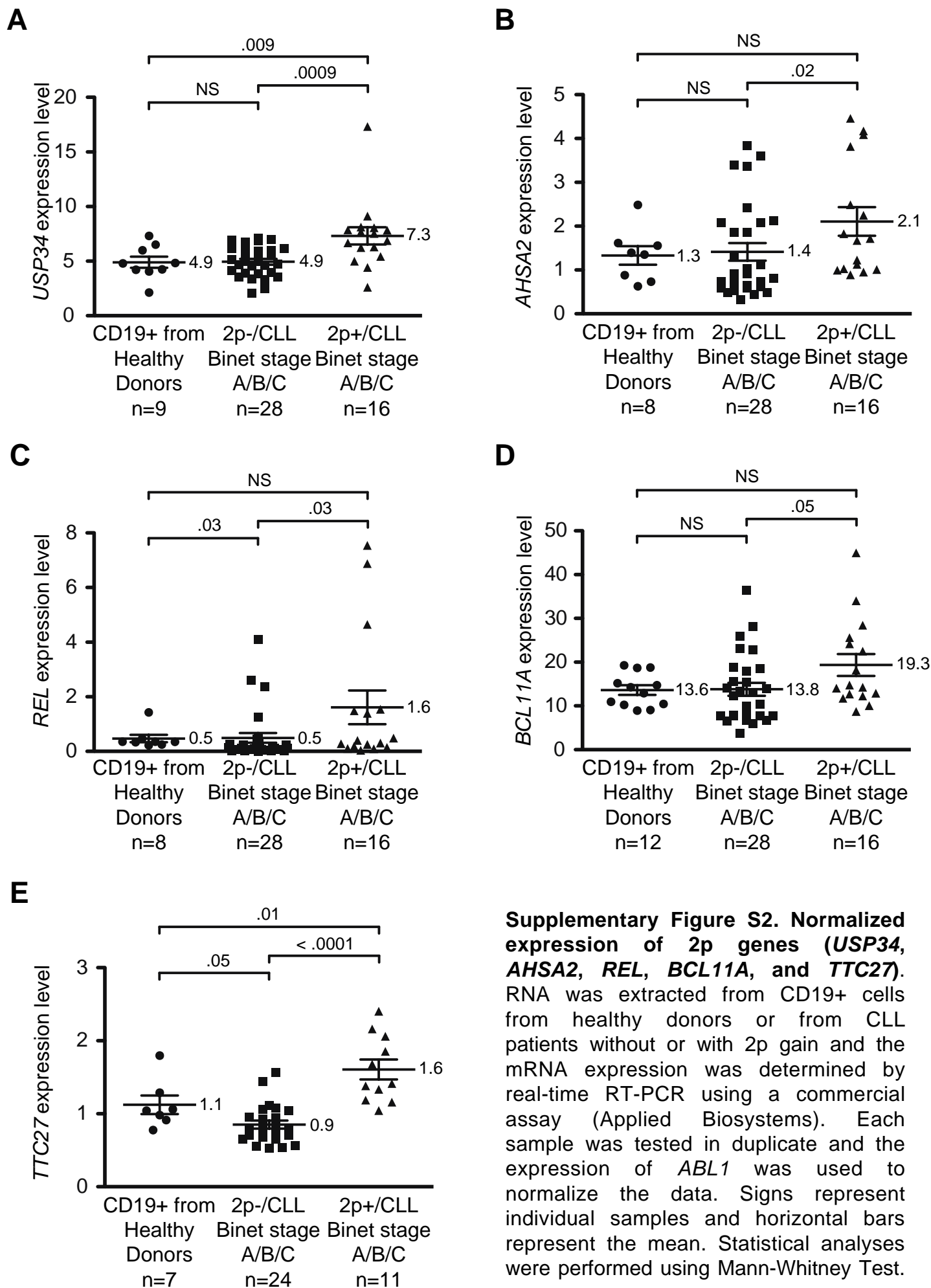
Supplementary Table S3. Longitudinal analysis of eight 2p+/CLL

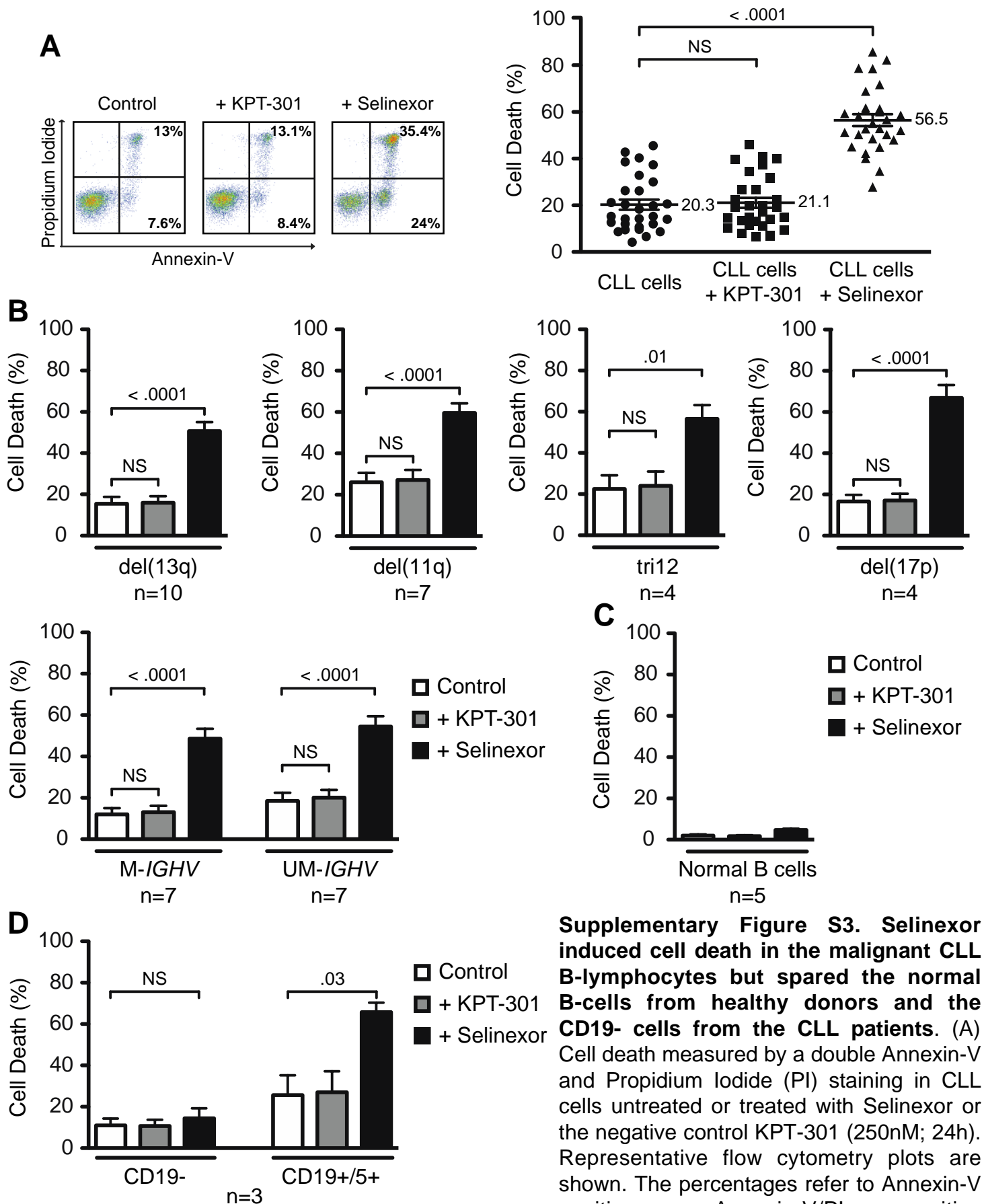
	CLL_36	CLL_18	CLL_06	CLL_28	CLL_21	CLL_07	CLL_08	CLL_09	CLL_12	CLL_13	CLL_22	CLL_23	CLL_03	CLL_34	CLL_20	CLL_24*	CLL_14	CLL_35	CLL_15	CLL_16	CLL_02	CLL_04	CLL_01	CLL_32	CLL_33	CLL_17	CLL_19	CLL_25	CLL_26	CLL_29	CLL30	CLL_11	CLL_10	CLL_31	CLL_27	CLL_05	
2p gain																																					
del(11q)																																					
del(13q)																																					
tri12																																					
del(17p)																																					
SF3B1 mut																																					
NOTCH1 mut																																					
TP53 mut																																					
XPO1 mut																																					
MYD88 mut																																					
IGHV unmut																																					

*Patient with the minimal 2p22.3 gain (excluding XPO1)

*Patient with the minimal 2p22.3 gain (excluding XPO1)

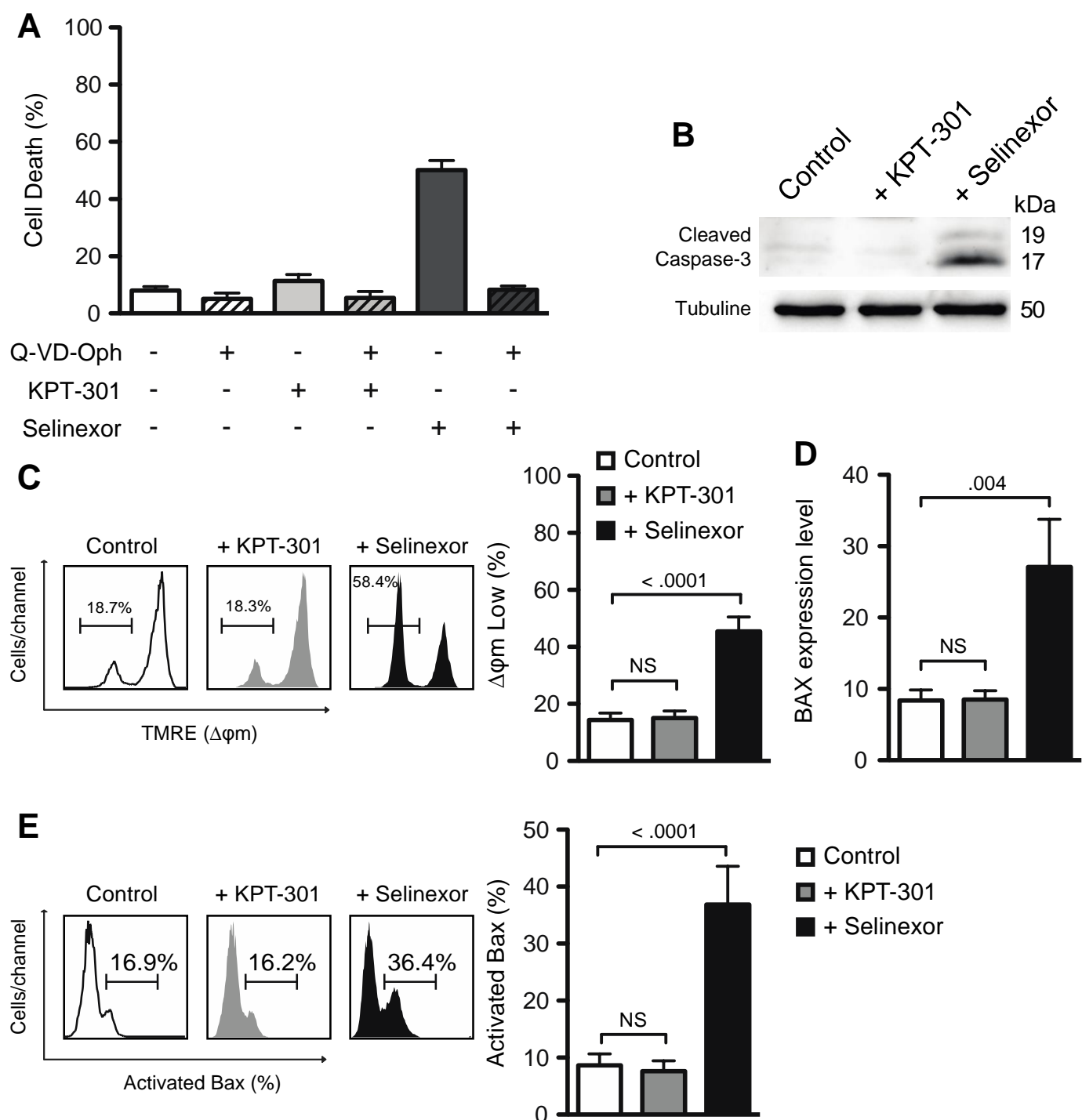
Supplementary Figure S1. Relationship of 2p+ with other cytogenetic and genetic aberrations characterizing CLL. Columns represent patients and lines represent genetic aberrations (grey: absence, black: presence of the abnormality, white: not done)





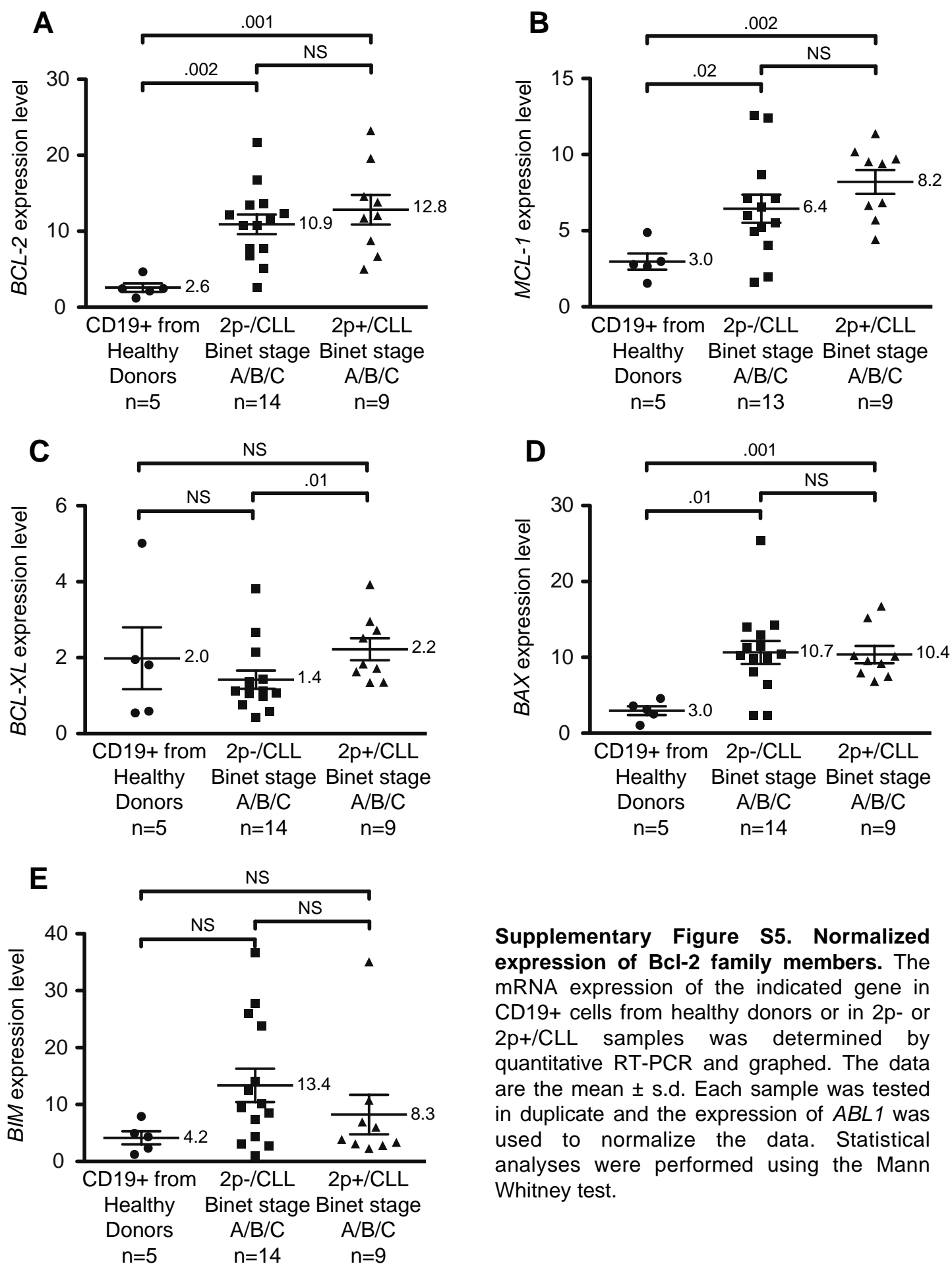
Supplementary Figure S3. Selenexor induced cell death in the malignant CLL B-lymphocytes but spared the normal B-cells from healthy donors and the CD19- cells from the CLL patients. (A) Cell death measured by a double Annexin-V and Propidium Iodide (PI) staining in CLL cells untreated or treated with Selenexor or the negative control KPT-301 (250nM; 24h). Representative flow cytometry plots are shown. The percentages refer to Annexin-V positive or Annexin-V/PI co-positive

staining. In the right panel, CLL cells were treated as above and graphed. The percentages refer to the mean of the Annexin-V positive staining \pm s.d. (n=29). (B) B-cells from CLL patients with positive or adverse prognostic features were treated as in (A) and plotted as the mean \pm s.d. M: mutated; UM: unmutated; del: deletion; tri: trisomy. (C-D) B-cells (CD19+) from healthy donors (n=5), CD19- and CD19+/CD5+ cells from CLL patients (n=3) were treated as in (A) and graphed. The percentages refer to the mean of the Annexin-V positive staining \pm s.d. The p value, assed by an Anova approach, is indicated. NS : non significant.



Supplementary Figure S4. Treatment with Selinexor promotes cell death through a caspase-dependent mechanism implicating the mitochondria and the proapoptotic protein Bax.

(A) CLL patients cells (n=3) were treated (+) or not (-) with Selinexor or the negative control KPT-301 (250 nM; 24 h) in the presence or the absence of the pan-caspase inhibitor Q-VD-Oph (10 μ M) and the percentage of cell death was evaluated by Annexin-V staining. The data are graphed as the mean \pm s.d. (B) A representative immunoblot of activated caspase-3 is shown for the untreated CLL cells (Control), KPT-301, or Selinexor-treated CLL cells. Equal loading was confirmed by α -tubulin probing. (C) Cells were untreated or treated with the negative control KPT-301 or Selinexor (250 nM; 24 h), then labeled with TMRE and assessed for $\Delta\psi_m$ (mitochondrial transmembrane potential) by flow cytometry. Results are the means of seven independent experiments \pm s.d. In cytometry panels, percentages refer to cells with $\Delta\psi_m$ loss. (D) BAX mRNA levels were determined in CLL B-cells (n=8) untreated or treated with KPT-301 or Selinexor (250 nM; 12 h). The numbers refer to the mean BAX transcript expression \pm s.d. The ABL1 mRNA expression was used to normalize the data. Statistical analyses were performed using Anova. (E) CLL cells were untreated or treated with KPT-301 or Selinexor as in (A), and Bax activation was measured by flow cytometry and illustrated as a bar chart. Data are the means \pm s.d. (n=8). In cytometry panels, percentages refer to cells with activated Bax.



Supplementary Figure S5. Normalized expression of Bcl-2 family members. The mRNA expression of the indicated gene in CD19+ cells from healthy donors or in 2p- or 2p+/CLL samples was determined by quantitative RT-PCR and graphed. The data are the mean \pm s.d. Each sample was tested in duplicate and the expression of *ABL1* was used to normalize the data. Statistical analyses were performed using the Mann Whitney test.

IV. Conclusion

Mon travail de doctorat a participé à la caractérisation de la cellule d'origine de la LLC et à l'étude de mécanismes de progression de la maladie.

Les premiers résultats de séquençage à haut débit rapportés dans la littérature n'ont pas permis d'identifier de mutation commune à toutes, ou au moins à la majorité des LLC. De nombreuses mutations récurrentes ont cependant été découvertes, et nous avons pu contribuer à la description de ces anomalies, en mettant en évidence des mutations récurrentes du gène *NFKBIE*, présentes dans environ 10% des LLC. Au delà d'éventuelles conséquences fonctionnelles communes, il faudra peut-être attendre d'autres approches plus complètes de caractérisation des LLC (parties non codantes du génome), pour identifier une (des) anomalie(s) récurrente(s) plus fréquente(s), voire un événement commun(s) à toutes les LLC.

La LLC a par ailleurs toujours été considérée comme une maladie de la cellule mature, et la publication de Kikushige *et al.* en 2011, suivant d'autres travaux, a été accueillie avec scepticisme. Nous avons néanmoins confirmé que la LLC se développe à partir d'une cellule progénitrice ayant acquis des mutations géniques. Avec ces nouveaux concepts, nous pouvons avancer dans la compréhension des hémopathies de l'adulte. La notion de cellule pré-leucémique dans la LLC ayant maintenant été prise en compte, des études similaires sont actuellement en cours dans d'autres hémopathies B matures.

La caractérisation des anomalies chromosomiques a été pendant de nombreuses années la porte d'entrée pour identifier des gènes et révéler les mécanismes d'oncogenèse, d'abord dans les hémopathies malignes, puis dans les tumeurs solides. Ces études présentaient donc un intérêt fondamental, mais également un intérêt appliqué, puisque ces recherches ont permis le développement de thérapies ciblées, et des avancées majeures dans la prise en charge des patients. Avec le développement des nouvelles technologies de séquençage à haut débit, d'autres portes d'entrée ont aidé à notre compréhension des cancers. Ces techniques, de par leur grande sensibilité pour détecter des anomalies à de très faibles taux, ont également confirmé la notion d'hétérogénéité tumorale, avec des anomalies dite « secondaires », additionnelles ou sous-clonales, mais pouvant jouer un rôle primordial, que ce soit dans la progression de la maladie et/ou la résistance au traitement. Il reste cependant encore de rares anomalies chromosomiques mal caractérisées, et qui sont des acteurs importants dans l'oncogenèse, puisqu'elles sont récurrentes, comme la délétion 14q et le gain 2p. Mon travail illustre le fait que la caractérisation d'anomalies chromosomiques peut avoir aussi (encore) un intérêt à notre époque.

Nous avons montré dans une grande série de LLC que la délétion 14q était associée à des facteurs de mauvais pronostic. Cette anomalie n'est pas recherchée de façon systématique chez les patients, et il serait pourtant intéressant d'inclure son analyse dans des protocoles prospectifs, afin de

définir son impact sur la survie globale. Au niveau moléculaire, nous n'avons pas identifié de gène(s) ou microARN(s) candidat(s), ni élucidé le mécanisme de la délétion 14q avec un point de cassure étonnement récurrent dans le gène *ZFP36L1*. Cette anomalie étant très souvent associée à la trisomie 12 d'une part, et aux mutations de *NOTCH1* d'autre part, il est probable qu'il existe des mécanismes de coopération oncogénique, qui restent à caractériser. La trisomie 12, qui reste elle aussi un mystère quant à ses conséquences moléculaires, est en fait très souvent associée à diverses anomalies chromosomiques dans la LLC (translocations t(14;19), t(14;18); trisomies 18, 19; del(14q) ...), ces anomalies n'étant pas recherchées de façon systématique, et donc souvent méconnues. Une approche globale de recherche de mutations géniques associée à la recherche d'anomalies chromosomiques semble nécessaire à cette pathologie. Enfin, comme toutes les anomalies chromosomiques observées dans la LLC, la délétion 14q n'est pas spécifique, et peut être observée dans d'autres hémopathies, d'où un intérêt majoré de la caractériser.

L'analyse du gain 2p, qui est une anomalie fréquente dans la LLC, n'est pas non plus recherchée de façon systématique chez les patients. C'est une anomalie qui peut être sous-clonale, mais qui semble jouer un rôle important dans la progression de la maladie et la résistance aux drogues. De plus, lors de suivi longitudinal de plusieurs patients, on s'aperçoit que le clone avec gain 2p reste similaire ou augmente après une rechute, mais ne diminue ou ne disparaît pas. Nous avons montré que le gain 2p était associé à des facteurs de mauvais pronostic, en particulier à la délétion *ATM*, et là encore il est probable que cette association révèle une coopération oncogénique. Notre approche a permis d'identifier deux régions minimales de gain, et il est probable que plusieurs gènes soient impliqués dans la pathogenèse. Je me suis focalisé sur le gène *XPO1* dans le cadre de ma thèse, et ai montré que le gène *XPO1* jouait un rôle important dans la résistance aux traitements.

J'ai ainsi mis en évidence d'une part que les LLC avec gain 2p étaient résistantes *in vitro* aux traitements actuellement utilisés dans la LLC, et d'autre part que les LLC avec gain 2p ou *XPO1* muté étaient résistantes *in vitro* au Selinexor, actuellement en phase I/II d'essais cliniques. Le Selinexor semble être une molécule avec un fort potentiel dans la LLC, puisqu'il agit spécifiquement sur les cellules tumorales des patients LLC, et ce indépendamment des facteurs classiques de mauvais pronostic. L'ensemble de nos résultats suggère que *XPO1* joue un rôle clé dans la résistance au Selinexor dans la LLC. Nous proposons donc de rechercher de façon systématique le gain 2p et les mutations de *XPO1* avant la prise en charge thérapeutique d'un patient LLC, et avant tout traitement par le Selinexor, que ce soit dans la LLC ou d'autres hémopathies. On sait qu'il est effectivement important de détecter les patients susceptibles de développer des résistances au traitement, afin de ne pas sélectionner des clones résistants et souvent plus agressifs.

V. Références Bibliographiques

1. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019–5033.
2. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood*. 2011;117(6):1781–91.
3. Hernandez JA, Land K, Robert W. Leukemias, Myeloma, and Other Lymphoreticular Neoplasms. *Cancer*. 1995;75(1):381–393.
4. Goldin LR, Slager SL, Caporaso NE. Familial Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2011;17(4):350–355.
5. Sellick GS, Goldin LR, Wild RW, et al. A high-density SNP genome-wide linkage search of 206 families identifies susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007;110(9):3326–3333.
6. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute – Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446–5456.
7. Kern W, Bacher U, Haferlach C, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis is closely related to chronic lymphocytic leukaemia and may be better classified as early-stage CLL. *Br. J. Haematol*. 2012;157(1):86–96.
8. Mulligan CS, Thomas ME, Milligan SP. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2008;2065–2066.
9. Shanafelt TD, Kay NE, Rabe KG, et al. Brief report: Natural history of individuals with clinically recognized monoclonal B-cell lymphocytosis compared with patients with Rai 0 chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol*. 2009;27(24):3959–3963.
10. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2008;359(6):575–583.
11. Mowery YM, Lanasa MC. Clinical aspects of Monoclonal B-cell lymphocytosis. *Cancer Control*. 2012;19(1):8–17.
12. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994;8(10):1640–1645.
13. Moreau E, Matutes E, A'Hern R, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am. J. Clin. Pathol*. 1997;108(4):378–82.
14. Rai KR, Sawitsky a, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219–34.

15. Rai K, Sawitsky A. A review of the prognostic role of cytogenetic, phenotypic, morphologic, and immune function characteristics in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells*. 1987;12(2):327–338.
16. Binet JL, Auquier a, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198–206.
17. Kröber A, Seiler T, Benner A, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100(4):1410–1416.
18. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood*. 2002;100(4):1177–1184.
19. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton L. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2014;1 – 8.
20. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Do H. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and VH gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia*. 2002;16(6):993–1007.
21. Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia : implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood*. 2008;111(3):1524–1533.
22. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2004;351(9):893–901.
23. Lafarge ST, Li H, Pauls DS, et al. ZAP70 expression directly promotes chronic lymphocytic leukaemia cell adhesion to bone marrow stromal cells. *Br. J. Haematol*. 2015;168(1):139–142.
24. Rosenwald a, Alizadeh a a, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med*. 2001;194(11):1639–1647.
25. Matis S, Vigna E, Todoerti K, et al. Is ZAP70 still a key prognostic factor in early stage chronic lymphocytic leukaemia? Results of the analysis from a prospective multicentre observational study. *Br. J. Haematol*. 2015;168(3):452–455.
26. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840–1847.
27. Cramer P, Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 2011;8(1):38–47.
28. Hamblin TJ, Orchard J a., Ibbotson RE, et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*. 2002;99(3):1023–1029.

29. Rosenquist R, Cortese D, Bhoi S, Mansouri L, Gunnarsson R. Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia : where do we stand ? *Leuk. Lymphoma*. 2013;54(February):2351–2364.
30. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*. 2004;163–83.
31. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner a, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2000;343(26):1910–6.
32. Shahjehani M, Mohammadiasl J, Noroozi F, et al. Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis. *Cell. Oncol*. 2015;93–109.
33. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1017–1029.
34. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med*. 2011;365(26):2497–506.
35. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS*. 2002;99(24):15524–15529.
36. Calin GA, Liu C, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *PNAS*. 2004;(9.):
37. Pekarsky Y, Croce CM. Role of miR-15/16 in CLL. *Cell Death Differ*. 2014;1–6.
38. Klein U, Lia M, Crespo M, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*. 2010;17(1):28–40.
39. Lia M, Carette a, Tang H, et al. Functional dissection of the chromosome 13q14 tumor suppressor locus using transgenic mouse lines. *Blood*. 2011;119(13):1–5.
40. Puiggros A, Delgado J, Rodriguez-Vicente A, et al. Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. *Br. J. Haematol*. 2013;163(1):47–54.
41. Letestu R, Lévy V, Eclache V, et al. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients : the strength of routine parameters Brief report Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients : the strength of routine parameters. *Blood*. 2010;116(22):4588–4590.
42. Sutton L, Chevret S, Tournilhac O, et al. Autologous stem cell transplantation as a first-line treatment strategy for chronic lymphocytic leukemia: a multicenter, randomized, controlled trial from the SFGM-TC and GFLLC. *Blood*. 2011;117(23):6109–19.
43. Lepretre S, Aurran T, Mahé B, et al. Excess mortality after treatment with fludarabine and cyclophosphamide in combination with alemtuzumab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia in a randomized phase 3 trial. *Blood*. 2012;119(22):5104–10.

44. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*. 2010;10(1):37–50.
45. Stankovic T, Stewart GS, Fegan C, et al. Ataxia telangiectasia mutated – deficient B-cell chronic lymphocytic leukemia occurs in pregerminal center cells and results in defective damage response and unrepaired chromosome damage. *Blood*. 2002;99(1):300–309.
46. Malek SN. The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*. 2013;32(23):2805–17.
47. Austen B, Powell JE, Alvi A, et al. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood*. 2005;106(9):3175–3182.
48. Bredemeyer AL, Sharma GG, Huang C-Y, et al. ATM stabilizes DNA double-strand-break complexes during V(D)J recombination. *Nature*. 2006;442(7101):466–470.
49. González-Gascón Y Marín, M H-S, AE R-V, et al. A high proportion of cells carrying trisomy 12 is associated with a worse outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol*. 2007;25(3):127–131.
50. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica*. 2012;97(3):437–41.
51. Watanabe T, Hotta T, Ichikawa a, et al. The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin. *Blood*. 1994;84(9):3158–3165.
52. Merup M, Juliusson G, Wu X, et al. Amplification of multiple regions of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur. J. Haematol*. 1997;58(3):174–180.
53. Zenz T, Eichhorst B, Busch R, et al. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol*. 2010;28(29):4473–9.
54. Edelmann J, Holzmann K, Miller F, et al. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*. 2012;120(24):4783–94.
55. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin. Cancer Res*. 2009;15(3):995–1004.
56. Dicker F, Herholz H, Schnittger S, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K*. 2009;23(1):117–124.
57. Beà S, López-Guillermo A, Ribas M, et al. Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). *Am. J. Pathol*. 2002;161(3):957–68.

58. Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S, et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *PNAS*. 2004;101(4):1039–44.
59. Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, et al. Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood*. 2007;109(3):1202–10.
60. Forconi F, Rinaldi A, Kwee I, et al. Genome-wide DNA analysis identifies recurrent imbalances predicting outcome in chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion. *Br. J. Haematol*. 2008;143(4):532–6.
61. Jarosova M, Urbankova H, Plachy R, et al. Gain of chromosome 2p in chronic lymphocytic leukemia: significant heterogeneity and a new recurrent dicentric rearrangement. *Leuk. Lymphoma*. 2010;51(2):304–13.
62. Chapiro E, Leporrier N, Radford-Weiss I, et al. Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk. Res*. 2010;34(1):63–68.
63. Deambrogi C, De Paoli L, Fangazio M, et al. Analysis of the REL, BCL11A, and MYCN proto-oncogenes belonging to the 2p amplicon in chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol*. 2010;85(7):541–544.
64. Rinaldi A, Mian M, Kwee I, et al. Genome-wide DNA profiling better defines the prognosis of chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol*. 2011;154(5):590–9.
65. Ma D, Chen Z, Patel KP, et al. Array comparative genomic hybridization analysis identifies recurrent gain of chromosome 2p25.3 involving the ACP1 and MYCN genes in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Lymphoma. Myeloma Leuk*. 2011;11 Suppl 1(June):S17–24.
66. Gunnarsson R, Mansouri L, Isaksson A, et al. Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2011;96(8):1161–1169.
67. Urbankova H, Papajik T, Plachy R, et al. Array-based karyotyping in chronic lymphocytic leukemia (CLL) detects new unbalanced abnormalities that escape conventional cytogenetics and CLL FISH panel. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub*. 2012;16(CII.):
68. Fabris S, Mosca L, Cutrona G, et al. Chromosome 2p gain in monoclonal B-cell lymphocytosis and in early stage chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol*. 2013;88(1):24–31.
69. Brejcha M, Stoklasová M, Brychtová Y, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization and conventional cytogenetics after stimulation with CpG oligonucleotides and interleukin-2: a prospective analysis. *Leuk. Res*. 2013;38(2):170–5.
70. Houldsworth J, Guttapalli A, Thodima V, et al. Genomic imbalance defines three prognostic groups for risk stratification of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma*. 2014;55(4):920–8.

71. Yin CC, Lin KI-C, Ketterling RP, et al. Chronic lymphocytic leukemia With t(2;14)(p16;q32) involves the BCL11A and IgH genes and is associated with atypical morphologic features and unmutated IgVH genes. *Am. J. Clin. Pathol.* 2009;131(5):663–70.
72. Satterwhite E, Sonoki T, Willis TG, et al. The BCL11 gene family : involvement of BCL11A in lymphoid malignancies The BCL11 gene family : involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Cytogenetics.* 2011;98(12):3413–3420.
73. Reindl L, Bacher U, Dicker F, et al. Biological and clinical characterization of recurrent 14q deletions in CLL and other mature B-cell neoplasms. *Br. J. Haematol.* 2010;151(1):25–36.
74. Pospisilova H, Baens M, Michaux L, et al. Interstitial del(14)(q) involving IGH: a novel recurrent aberration in B-NHL. *Leukemia.* 2007;21(9):2079–2083.
75. Rossi D, Rasi S, Spina V, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2013;121(8):1403–12.
76. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 2011;475(7354):101–5.
77. Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat. Genet.* 2012;44(1):47–52.
78. Rossi D, Rasi S, Spina V, et al. Different impact of NOTCH1 and SF3B1 mutations on the risk of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *Br. J. Haematol.* 2012;158(3):426–9.
79. Mori J, Takahashi Y, Tanimoto T. SF3B1 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2012;1057–1058.
80. Oscier DG, Rose-Zerilli MJJ, Winkelmann N, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood.* 2013;121(3):468–75.
81. Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, et al. Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood.* 2012;119(14):3203–10.
82. Foà R, Del Giudice I, Guarini A, Rossi D, Gaidano G. Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2013;98(5):675–685.
83. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, et al. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia.* 2014;28(1):108–17.
84. Xu Z-S, Zhang J-S, Zhang J-Y, et al. Constitutive activation of NF-κB signaling by NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncol. Rep.* 2015;1–6.
85. Rossi D, Ciardullo C, Spina V, Gaidano G. Molecular bases of chronic lymphocytic leukemia in light of new treatments. *Immunol. Lett.* 2013;1–5.

86. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, et al. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood*. 2012;119(2):329–31.
87. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J. Exp. Med.* 2011;208(7):1389–401.
88. Martínez-Trillos A, Pinyol M, Navarro A, et al. Mutations in the Toll-like receptor/MYD88 pathway in chronic lymphocytic leukemia identify a subset of young patients with favorable outcome. *Blood*. 2014;123(24):3790–6.
89. Rose-Zerilli MJ, Gonzalez D, Gomez B, et al. 4.18 The Clinical Significance of NOTCH1 and MYD88 Mutations in Patients Enrolled onto the UK CLL4 Treatment Trial and in an Early Stage A CLL Cohort. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 2011;11(October):S229.
90. Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia. *N. Engl. J. Med.* 2012;367(9):826–833.
91. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012;109(10):3879–3884.
92. Hutten S, Kehlenbach RH. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends Cell Biol.* 2007;17(4):193–201.
93. Sutton L -a., Ljungstrom V, Mansouri L, et al. Targeted next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia: a high-throughput yet tailored approach will facilitate implementation in a clinical setting. *Haematologica*. 2014;100(3):370–376.
94. Bergsagel PL, Kuehl WM. Comprehensive identification of somatic mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2011;20(1):5–7.
95. Landau D a, Carter SL, Stojanov P, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 2013;152(4):714–26.
96. Schuh A, Becq J, Humphray S, et al. Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood*. 2012;120(20):4191–4196.
97. Ouillette P, Saiya-Cork K, Seymour E, et al. Clonal evolution, genomic drivers, and effects of therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2013;19(11):2893–904.
98. Gahn B, Schäfer C, Neef J, et al. Detection of trisomy 12 and Rb-deletion in CD34+ cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1997;89(12):4275–81.
99. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2011;20(2):246–259.
100. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, et al. Chlorambucil in indolent Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1998;338(21):1506–1514.

101. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment – Instructions on Receiving Credit. *Am. J. Hematol.* 2015;90(5):
102. Dreger P, Corradini P, Kimby E, et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K.* 2007;21(1):12–17.
103. Lu K, Wang X. Therapeutic advancement of chronic lymphocytic leukemia. *J. Hematol. Oncol.* 2012;5(1):55.
104. Leoni LM, Hartley J a. Mechanism of Action: The Unique Pattern of Bendamustine-Induced Cytotoxicity. *Semin. Hematol.* 2011;48(SUPPL. 1):S12–S23.
105. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2010;376(9747):1164–1174.
106. Pettitt a R, Matutes E, Oscier D. Alemtuzumab in combination with high-dose methylprednisolone is a logical, feasible and highly active therapeutic regimen in chronic lymphocytic leukaemia patients with p53 defects. *Leukemia.* 2006;20(8):1441–1445.
107. Stevenson FKF, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2011;118(16):4313–4320.
108. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 2011;105(12):4820–4827.
109. Woyach J a, Furman RR, Liu T-M, et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N. Engl. J. Med.* 2014;370(24):2286–94.
110. De Rooij MFM, Kuil A, Kater A, et al. Ibrutinib and idelalisib synergistically target BCR-controlled adhesion in MCL and CLL: a rationale for combination therapy. *Blood.* 2015;125(14):2306–2309.
111. Cervantes-Gomez F, Lamothe B, Woyach J a., et al. Pharmacological and protein profiling suggest ABT-199 as optimal partner with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2015;
112. Veldurthy A, Patz M, Hagist S, et al. The kinase inhibitor dasatinib induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro with preference for a subgroup of patients with unmutated IgV H genes. *Blood.* 2008;112(4):1443–1452.
113. Kater AP, Spiering M, Liu RD, et al. Dasatinib in combination with fludarabine in patients with refractory chronic lymphocytic leukemia: A multicenter phase 2 study. *Leuk. Res.* 2014;38(1):34–41.
114. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, et al. ABT-263: A potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* 2008;68(9):3421–3428.

115. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* 2013;19(2):202–8.
116. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: Results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J. Clin. Oncol.* 2012;30(5):488–496.
117. Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell.* 2011;147(4):742–758.
118. Tower J. Programmed cell death in aging. *Ageing Res. Rev.* 2015;23:90–100.
119. Duffy MJ, Synnott NC, McGowan PM, et al. P53 As a Target for the Treatment of Cancer. *Cancer Treat. Rev.* 2014;40(10):1153–1160.
120. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of Cell Death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3–11.
121. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):107–120.
122. Kerr JF., Wyllie A., Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972;26(4):239–57.
123. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science* (80-.). 1998;281(August):1312–1317.
124. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* 2011;351(1-2):41–58.
125. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003;15(6):725–731.
126. Khan KH, Blanco-Codecido M, Molife LR. Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2014;90(3):200–219.
127. Delbridge a RD, Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 2015;22(7):1071–1080.
128. Mohammad RM, Muqbil I, Lowe L, et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2015;1–26.
129. Pepper C, Lin TT, Pratt G, et al. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood.* 2008;112(9):3807–3818.
130. Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, et al. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ.* 2008;15(7):1113–23.

131. Soussi T. TP53 Mutations in Human Cancer: Database Reassessment and Prospects for the Next Decade. Elsevier Inc.; 2011.
132. Laptenko O, Prives C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ.* 2006;13(6):951–961.
133. Mihara M, Erster S, Zaika A, et al. P53 Has a Direct Apoptogenic Role At the Mitochondria. *Mol. Cell.* 2003;11(3):577–590.
134. Mignotte B, Vayssiere J. Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem. FEBS.* 1998;252(1):1–15.
135. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell.* 2010;37(3):299–310.
136. Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, et al. Mitochondrial gateways to cancer. *Mol. Aspects Med.* 2010;31(1):1–20.
137. Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog. Neurobiol.* 2014;112:24–49.
138. Vandenabeele P, Orrenius S, Zhivotovsky B. Serine proteases and calpains fulfill important supporting roles in the apoptotic tragedy of the cellular opera. *Cell Death Differ.* 2005;12(9):1219–1224.
139. Zörnig M, Hueber AO, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* 2001;1551(2):1–37.
140. Di Bacco a, Keeshan K, McKenna SL, Cotter TG. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist.* 2000;5(5):405–415.
141. O'Reilly L a, Strasser a. Apoptosis and autoimmune disease. *Inflamm. Res.* 1999;48(1):5–21.
142. Burger J a, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies : a target for new treatment strategies Review article The microenvironment in mature B-cell malignancies : a target for new treatment strategies. *Blood.* 2009;114(16):3367–3375.
143. Loeder S, Zenz T, Schnaiter A, et al. A novel paradigm to trigger apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 2009;69(23):8977–8986.
144. Smit L a, Hallaert DYH, Goeij B De, Jaspers A, Kater AP. Differential Noxa / Mcl-1 balance in peripheral versus lymph node chronic lymphocytic leukemia cells correlates with survival capacity. *Apoptosis.* 2007;109(4):1660–1668.
145. Pepper C, Bentley P, Hoy T. Regulation of clinical chemoresistance by bcl-2 and bax oncoproteins in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 1996;95(3):513–517.
146. Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, et al. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science (80-.).* 1984;224(4656):1403–1406.

147. Castle VP, Heidelberger KP, Bromberg J, et al. Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2, in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification. *Am. J. Pathol.* 1993;143(6):1543–1550.
148. Balakrishnan K, Gandhi V. Bcl-2 antagonists: a proof of concept for CLL therapy. *Invest. New Drugs.* 2013;(Cml.):
149. Billard C. Design of novel BH3 mimetics for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2012;26(9):2032–8.
150. Li Y, Li L-J, Wang L-J, et al. Selective intra-arterial infusion of rAd-p53 with chemotherapy for advanced oral cancer: a randomized clinical trial. *BMC Med.* 2014;12:16.
151. Takizawa CG, Morgan DO. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000;12(6):658–665.
152. Ferrando-May E. Nucleocytoplasmic transport in apoptosis. *Cell Death Differ.* 2005;12(10):1263–1276.
153. Turner JG, Dawson J, Sullivan DM. Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Biochem. Pharmacol.* 2011;83(8):1021–32.
154. Raices M, D'Angelo M a. Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012;13(11):687–699.
155. Chook YM, Süel KE. Nuclear import by karyopherin-βs: Recognition and inhibition. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2011;1813(9):1593–1606.
156. Tran EJ, Bolger T a., Wente SR. SnapShot: Nuclear Transport. *Cell.* 2007;131(2):1–2.
157. Xu D, Farmer A, Chook YM. Recognition of nuclear targetin signals by Karyopherin-b proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2011;20(6):782–790.
158. Marfori M, Mynott A, Ellis JJ, et al. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2011;1813(9):1562–1577.
159. Fung HYJ, Chook YM. Atomic basis of CRM1-cargo recognition, release and inhibition. *Semin. Cancer Biol.* 2014;27:52–61.
160. Reich NC, Liu L. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6(8):602–612.
161. Görlich D, Dabrowski M, Bischoff FR, et al. A novel class of RanGTP binding proteins. *J. Cell Biol.* 1997;138(1):65–80.
162. Monecke T, Dickmanns A, Ficner R. Allosteric control of the exportin CRM1 unraveled by crystal structure analysis. *FEBS J.* 2014;1–16.
163. Cook A, Bono F, Jinek M, Conti E. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu. Rev. Biochem.* 2007;76:647–671.

164. Lott K, Cingolani G. The importin β binding domain as a master regulator of nucleocytoplasmic transport. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011;1813(9):1578–92.
165. Stade K, Ford CS, Guthrie C, Weis K. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell*. 1997;90(6):1041–50.
166. Elfand C, Rosorius O, Hofer L, et al. Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999;96(May):6229–6234.
167. Xu D, Grishin N V., Chook YM. NESdb: a database of NES-containing CRM1 cargoes. *Mol. Biol. Cell*. 2012;23(18):3673–3676.
168. Fu S-C, Huang H-C, Horton P, Juan H-F. ValidNESs: a database of validated leucine-rich nuclear export signals. *Nucleic Acids Res*. 2012;41(Database issue):D338–D343ww.
169. Nair R, Carter P, Rost B. NLSdb: Database of nuclear localization signals. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(1):397–399.
170. Noske A, Weichert W, Niesporek S, et al. Expression of the nuclear export protein chromosomal region maintenance/exportin 1/Xpo1 is a prognostic factor in human ovarian cancer. *Cancer*. 2008;112(8):1733–43.
171. Yao Y, Dong Y, Lin F, Zhao HUI, Shen ZAN. The expression of CRM1 is associated with prognosis in human osteosarcoma. *Oncol. Rep*. 2009;229–235.
172. Pathria G, Wagner C, Wagner SN. Inhibition of CRM1-Mediated Nucleocytoplasmic Transport: Triggering Human Melanoma Cell Apoptosis by Perturbing Multiple Cellular Pathways. *J. Invest. Dermatol*. 2012;132(12):2780–2790.
173. Shen A, Wang Y, Zhao Y, et al. Expression of CRM1 in human gliomas and its significance in p27 expression and clinical prognosis. *Neurosurgery*. 2009;65(1):153–9.
174. Zhang K, Wang M, Tamayo AT, et al. Novel selective inhibitors of nuclear export CRM1 antagonists for therapy in mantle cell lymphoma. *Exp. Hematol*. 2013;41(1):67–78.e4.
175. Walker CJ, Oaks JJ, Santhanam R, et al. Preclinical and clinical efficacy of XPO1/CRM1 inhibition by the karyopherin inhibitor KPT-330 in Ph+ leukemias. *Blood*. 2013;122(17):3034–44.
176. Schmidt J, Braggio E, Kortuem KM, et al. Genome-wide studies in multiple myeloma identify XPO1/CRM1 as a critical target validated using the selective nuclear export inhibitor KPT-276. *Leukemia*. 2013;27(12):2357–65.
177. Kojima K, Kornblau SM, Ruvolo V, et al. Prognostic impact and targeting of CRM1 in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(20):4166–74.
178. Bond J, Bergon A, Durand A, et al. Cryptic XPO1-MLLT10 translocation is associated with HOXA locus deregulation in T-ALL. *Blood*. 2014;124(19):3023–5.

179. Lapalombella R, Sun Q, Williams K, et al. Selective inhibitors of nuclear export show that CRM1/XPO1 is a target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;120(23):4621–34.
180. Takeda A, Yaseen NR. Nucleoporins and nucleocytoplasmic transport in hematologic malignancies. *Semin. Cancer Biol.* 2014;1–8.
181. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N. Engl. J. Med.* 2005;352(3):254–266.
182. Falini B, Bolli N, Shan J, et al. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood*. 2006;107(11):4514–4523.
183. Newlands ES, Rustin GJ, Brampton MH. Phase I trial of elactocin. *Br. J. Cancer*. 1996;74(4):648–9.
184. Turner JG, Dawson J, Cubitt CL, Baz R, Sullivan DM. Inhibition of CRM1-dependent nuclear export sensitizes malignant cells to cytotoxic and targeted agents. *Semin. Cancer Biol.* 2014;1–12.
185. Turner JG, Marchion DC, Dawson JL, et al. Human multiple myeloma cells are sensitized to topoisomerase II inhibitors by CRM1 inhibition. *Cancer Res.* 2009;69(17):6899–905.
186. Sakakibara K, Saito N, Sato T, et al. CBS9106 is a novel reversible oral CRM1 inhibitor with CRM1 degrading activity. *Blood*. 2011;118(14):3922–31.
187. Gravina GL, Tortoreto M, Mancini A, et al. XPO1/CRM1-Selective Inhibitors of Nuclear Export (SINE) reduce tumor spreading and improve overall survival in preclinical models of prostate cancer (PCa). *J. Hematol. Oncol.* 2014;7(1):46.
188. Inoue H, Kauffman M, Shacham S, et al. CRM1 Blockade by Selective Inhibitors of Nuclear Export Attenuates Kidney Cancer Growth. *J. Urol.* 2013;189(6):2317–2326.
189. Salas Fragomeni R a, Chung HW, Landesman Y, et al. CRM1 and BRAF inhibition synergize and induce tumor regression in BRAF-mutant melanoma. *Mol. Cancer Ther.* 2013;12(7):1171–9.
190. Yang J, Bill M a, Young GS, et al. Novel Small Molecule XPO1/CRM1 Inhibitors Induce Nuclear Accumulation of TP53, Phosphorylated MAPK and Apoptosis in Human Melanoma Cells. *PLoS One*. 2014;9(7):e102983.
191. Sun H, Hattori N, Chien W, et al. KPT-330 has antitumour activity against non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer*. 2014;111(2):281–91.
192. Zheng Y, Gery S, Sun H, et al. KPT-330 inhibitor of XPO1-mediated nuclear export has anti-proliferative activity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2014;1 – 9.
193. Etchin J, Sanda T, Mansour MR, et al. KPT-330 inhibitor of CRM1 (XPO1)-mediated nuclear export has selective anti-leukaemic activity in preclinical models of T-cell acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2013;161(1):117–27.

194. Ranganathan P, Yu X, Na C, et al. Preclinical activity of a novel CRM1 inhibitor in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;120(9):1765–73.
195. Turner JG, Dawson J, Emmons MF, et al. CRM1 Inhibition Sensitizes Drug Resistant Human Myeloma Cells to Topoisomerase II and Proteasome Inhibitors both In Vitro and Ex Vivo. *J. Cancer*. 2013;4(8):614–25.
196. Etchin J, Sun Q, Kentsis A, et al. Antileukemic activity of nuclear export inhibitors that spare normal hematopoietic cells. *Leukemia*. 2013;27(1):66–74.
197. Zhong Y, El-Gamal D, Dubovsky J a, et al. Selinexor suppresses downstream effectors of B-cell activation, proliferation and migration in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2014;(January):1–5.
198. Hing Z a., Mantel R, Beckwith K a., et al. Selinexor is effective in acquired resistance to ibrutinib and synergizes with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;
199. Emmerich F, Theurich S, Hummel M, et al. Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin / Reed – Sternberg cells. *J. Pathol*. 2003;(August):413–420.
200. Mansouri L, Sutton L -a., Ljungstrom V, et al. Functional loss of I B leads to NF- B deregulation in aggressive chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med*. 2015;
201. Zekavati A, Nasir A, Alcaraz A, et al. Post-transcriptional regulation of BCL2 mRNA by the RNA-binding protein ZFP36L1 in malignant B cells. *PLoS One*. 2014;9(7.):
202. Hodson DJ, Janas ML, Galloway A, et al. Deletion of the RNA-binding proteins Zfp36l1 and Zfp36l2 leads to perturbed thymic development and T-lymphoblastic leukaemia. *Nat. Immunol*. 2010;11(8):717–724.

Résumé : La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la plus fréquente des leucémies de l'adulte dans les pays occidentaux. Les événements oncogéniques à l'origine du développement de la LLC sont peu connus. La caractérisation cytogénétique et moléculaire de la LLC est donc primordiale pour une meilleure compréhension de l'oncogenèse, et pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Mon travail de thèse a initialement porté sur l'identification de la cellule d'origine de la LLC. Nous avons montré que la LLC se développe à partir de cellules hématopoïétiques progénitrices, ces cellules ayant les mêmes mutations acquises que les cellules tumorales de LLC. J'ai d'autre part participé à la caractérisation d'une délétion chromosomique récurrente, la délétion 14q, dans une large série de patients. Nous avons montré qu'elle était associée à la trisomie 12, et à d'autres facteurs de mauvais pronostic comme le statut *IGHV* non-muté, les mutations de *NOTCH1*, et une survie sans traitement courte. Enfin, la partie la plus importante de ma thèse a été consacrée à la caractérisation moléculaire et fonctionnelle du gain 2p. J'ai identifié le gène *XPO1* comme gène candidat dans le gain 2p, et comme une cible potentielle pour le traitement de la LLC. *XPO1*, qui est également muté de façon récurrente dans la LLC, code pour une exportine jouant un rôle majeur dans l'export nucléocytoplasmique de plus de 200 protéines. J'ai mis en évidence que l'inhibition pharmacologique de *XPO1* par le Selinexor, induisait la mort spécifiquement dans les cellules tumorales de LLC. Cependant, la présence de la mutation de *XPO1* ou du gain 2p dans les cellules de patients LLC confère une résistance à l'apoptose induite par le Selinexor. De plus, les cellules de patients LLC avec gain 2p sont résistantes aux traitements actuellement utilisés, démontrant l'importance de détecter cette anomalie en clinique.

Mots clés : leucémie lymphoïde chronique, cellule pré-leucémique, *NFKBIE*, délétion 14q, gain 2p, *XPO1*, Selinexor/KPT-330

Abstract: Chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most common adulthood leukemia, is characterized by an accumulation of abnormal CD5⁺ B-lymphocytes in the peripheral blood, bone marrow, and secondary lymphoid organs. The origin and pathogenic mechanisms of CLL are not fully understood. Identifying the deregulation of new genes is important to improve our understanding about CLL development and evolution, and to propose new targeted strategies. First, we have shown that CLL develops from pre-leukemic multipotent hematopoietic progenitors carrying somatic mutations. I have also analyzed the deletion 14q in a large series of patients, and we have concluded that del(14q) was associated with trisomy 12 and with pejorative prognostic factors: unmutated *IGHV*, *NOTCH1* mutations, and a short treatment-free survival. Finally, the main part of my thesis was about the characterization of the short arm of chromosome 2 (2p). I identified a minimal region gained in 2p+/CLL patients and demonstrated that *CRM1/XPO1* (*Exportin-1*) is located in this region, and recurrently mutated in CLL. I demonstrated that 2p gain provokes FCR, Ibrutinib, R-Idelalisib, and Selinexor drug resistance. Our results also reveal that Selinexor is inefficient in inducing apoptosis in CLL B-cells with mutations in *XPO1*. Altogether, my work advocates for the assessment of the 2p+ and *XPO1* mutations before deciding a CLL therapy.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, pre-leukemic cell, *NFKBIE*, 14q deletion, 2p gain, *XPO1*, Selinexor/KPT-330